

ESTUDIO DE NUEVOS MARCADORES DE INFERTILIDAD MASCULINA

Anaís García Rodríguez

Tesis Doctoral

2018





Rosa Roy Barcelona, Profesora Titular de Genética del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada **“Estudio de nuevos marcadores de infertilidad masculina”**, que se recoge en la presente Memoria, de la que es autora Anaís García Rodríguez y que ha sido realizada bajo mi dirección en el periodo comprendido entre los años 2014-2018 en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Biología (RD 99/2011) con Mención Internacional por la Universidad Autónoma de Madrid.

Lo que suscribo como directora del trabajo, en Madrid a 28 de enero de 2018

Fdo: Rosa Roy Barcelona

A mi abuelo Francisco, por la genética,
y a mi madre, por la epigenética.

*“La ciencia constituye la base de todo progreso
que facilita la vida humana y disminuye el sufrimiento”*

Marie Skłodowska Curie

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ABREVIATURAS	19
RESUMEN	23
SUMMARY	27
INTRODUCCIÓN	31
1) Enfoque tradicional del estudio de la infertilidad masculina	33
1.1) Definición de infertilidad	33
1.2) Abordaje clínico actual del varón infértil	33
1.3) El seminograma clásico	34
2) Nuevos aspectos de interés en el estudio de la infertilidad masculina	36
2.1) Controversia respecto al uso del seminograma clásico.....	36
2.2) Nuevos tests de funcionalidad espermática	38
2.3) Fragmentación del DNA espermático.....	40
2.4) Estrés oxidativo.....	45
2.5) Sistemas biológicos de defensa en el espermatozoide.....	51
2.6) Prostatosomas e infertilidad	57
3) Búsqueda de biomarcadores de infertilidad masculina	63
3.1) Enfoque genómico	64
3.2) Enfoque proteómico.....	65
3.3) Enfoque metabolómico	65
3.4) Breve descripción de los enfoques empleados en esta tesis doctoral	65
OBJETIVOS	67
MATERIAL Y MÉTODOS	71
1) Muestras	73
2) Seminograma tradicional.....	73
3) Fragmentación del DNA espermático	73
4) Estrés oxidativo	74
5) Análisis genotípico	75
5.1) Extracción del DNA espermático mediante el método fenol-cloroformo	75

5.2) Genotipado	76
6) Análisis de actividad de la enzima catalasa en el plasma seminal	78
6.1) Análisis de expresión de catalasa mediante western blot	78
6.2) Estudio de actividad catalasa en gel.....	79
7) Análisis de expresión de la enzima catalasa en el espermatozoide	80
7.1) Extracción del RNA.....	81
7.2) Retrotranscripción.....	81
7.3) PCR semicuantitativa.....	82
7.4) Real time PCR.....	82
8) Análisis de la presencia de prostasomas en los plasmas seminales.....	83
8.1) Aislamiento de exosomas de plasma seminal	83
8.2) Caracterización morfológica.....	83
8.3) Análisis mediante espectrometría de masas de la carga proteica de los prostasomas	84
8.4) Validación de los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas	86
8.5) Análisis del contenido en DNA de los prostasomas	87
9) Análisis estadístico	88
10) Recursos informáticos	88
RESULTADOS	91
1) Análisis descriptivo de la población.....	93
1.1) Parámetros seminales.....	93
1.2) Frecuencias genotípicas	96
2) Análisis genotípico de la población.....	99
2.1) Análisis genotípico para las enzimas de reparación	99
2.2) Análisis genotípico para las enzimas antioxidantes.....	102
2.3) Análisis funcional del polimorfismo CAT C-262T	108
3) Estudio de los prostasomas como fuente de marcadores de infertilidad	115
3.1) Descripción morfológica de los prostasomas	115
3.2) Estudio descriptivo de la carga proteica de los prostasomas	116
3.3) Estudio comparativo de la carga proteica de los prostasomas.....	121
3.4) Estudio del contenido de DNA de los prostasomas.....	130
DISCUSIÓN.....	133
1) Análisis descriptivo de la población	135

2) Análisis genotípico de la población.....	136
2.1) Análisis genotípico para las enzimas de reparación	136
2.2) Análisis genotípico para las enzimas antioxidantes.....	140
2.3) Polimorfismo CAT C-262T e infertilidad masculina	144
3) Estudio de los prostasomas como fuente de marcadores de infertilidad	151
3.1) Descripción morfológica de los prostasomas	152
3.2) Estudio de la carga proteica de los prostasomas	152
3.3) Estudio del contenido de DNA de los prostasomas	160
4) Discusión general	161
CONCLUSIONES.....	165
CONCLUSIONS	169
BIBLIOGRAFÍA	173
ANEXO I: PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS	201
ANEXO II: PRESENTACIONES EN CONGRESOS.....	205
ANEXO III: PERMISO DEL COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA UAM.....	209
AGRADECIMIENTOS.....	213

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores referencia incluidos en el último Manual de Laboratorio para el Análisis de Semen de la OMS (2010)	36
Tabla 2: Test de funcionalidad espermática	39
Tabla 3: Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	45
Tabla 4: Principales características de los 3 tipos de vesículas extracelulares.....	58
Tabla 5: Registro de polimorfismos analizados en esta tesis doctoral	66
Tabla 6: Análisis de polimorfismos mediante RFLP. Amplificación mediante PCR	76
Tabla 7: Análisis de polimorfismos mediante RFLP. Condiciones de las PCRs.	76
Tabla 8: Análisis de polimorfismos mediante RFLP. Digestión enzimática	77
Tabla 9: Análisis de variantes nulas mediante PCR multiplex.....	77
Tabla 10: Análisis de variantes nulas mediante PCR multiplex. Condiciones PCR	78
Tabla 11: Composición de los geles empleados para valorar la cantidad de catalasa....	78
Tabla 12: Composición de los geles empleados para valorar actividad catalasa	80
Tabla 13: Composición del tampón de carga empleado para los geles nativos	80
Tabla 14: Condiciones de la retrotranscripción.....	81
Tabla 15: Primers empleados en las PCRs semicuantitativas	82
Tabla 16: Condiciones de la PCR semicuantitativa para la catalasa	82
Tabla 17: Condiciones de la PCR semicuantitativa para la protamina 2	82
Tabla 18: Composición tampón RIPA	87
Tabla 19: Análisis descriptivo de la población muestral completa (393 muestras) para los valores incluidos en el seminograma tradicional	93
Tabla 20: Análisis descriptivo de la población muestral para los valores incluidos en el seminograma tradicional. Los valores aparecen clasificados en función del tipo de la subpoblación (pacientes (313) o donantes (80)).....	94
Tabla 21: Análisis descriptivo de la población muestral para los valores incluidos en el seminograma tradicional. Los valores aparecen clasificados en función del diagnóstico general proporcionado por el seminograma clásico (normozoospermica (173) o patológica (219)).....	95
Tabla 22: Frecuencias genotípicas observadas para el conjunto de la población.....	97
Tabla 23: Comparación de frecuencias genotípicas entre pacientes y donantes para los SNPs OGG1 Ser326Cys y XRCC1 Arg399Gln	99
Tabla 24: Comparación según genotipos para los SNPs OGG1 Ser326Cys y XRCC1 Arg399Gln de los valores medios obtenidos para cada parámetro en el seminograma clásico	101

Tabla 25: Comparación de frecuencias genotípicas entre donantes, pacientes con diagnóstico normozoospermicos y pacientes con diagnóstico patológico para los SNPs OGG1 Ser326Cys y XRCC1 Arg399Gln.....	102
Tabla 26: Comparación de frecuencias genotípicas entre pacientes y donantes para los polimorfismos SOD2 Ile58Thr, SOD2 Ala16Val, CAT C-262T y GPX Pro200Leu y para las variantes nulas de dos enzimas de la familia de la GST, GSTT y GST.....	103
Tabla 27: comparación según genotipos para los polimorfismos SOD2 Ile58Thr, SOD2 Ala16Val, CAT C-262T y GPX Pro200Leu y para las variantes nulas de la GST, GSTT y GST de los valores medios obtenidos para cada parámetro en el seminograma clásico	107
Tabla 28: Comparación según genotipos para el polimorfismo CAT C-262T de los valores medios obtenidos para cada parámetro en el seminograma clásico.....	110
Tabla 29: Predicción <i>in silico</i> de la unión de factores de transcripción en la región del promotor del gen de la catalasa en la que se localiza el SNP CAT C-262T	111
Tabla 30: Valores medios de actividad catalasa y cantidad de enzima para cada genotipo del SNP CAT C-262T.....	112
Tabla 31: Valores medios de actividad catalasa, cantidad de enzima e índice de fragmentación del DNA en función de los niveles de estrés oxidativo seminal	114
Tabla 32: Medias obtenidas para los distintos parámetros utilizados para caracterizar los pellets de prostasomas	115
Tabla 33: Comparación entre prostasomas obtenidos de muestras normozoospermicas y no normozoospermicas para los distintos parámetros utilizados para caracterizar los pellets de prostasomas.	116
Tabla 34: cantidad de proteínas detectadas en cada pool de prostasomas	117
Tabla 35: Lista de proteínas prostasómicas detectadas en el ITRAQ fraccionado cuyas anotaciones Gene Ontology corresponden con las categorías “proteínas con implicación en los procesos de reproducción” y “proteínas con actividad antioxidante”	119
Tabla 36: Selección de proteínas prostasómicas que aparecen en todos los aislados de un grupo y en ninguno del otro grupo	122
Tabla 37: Proteínas con niveles de expresión significativamente diferentes en prostasomas de varones no normozoospermicos en comparación con prostasomas de varones normozoospermicos.	126
Tabla 38: Valores medios obtenidos al realizar el análisis de imagen del gel obtenido en la validación por pooles de las proteínas HK1 y LDHC en prostasomas mediante western blot.	129
Tabla 39: Valores medios obtenidos al realizar el análisis de imagen del gel obtenido en la validación por muestras de las proteínas HK1 y LDHC en prostasomas mediante western blot	130
Tabla 41: Medidas de absorbancia y concentración de DNA para los prostasomas aislados de muestras normozoospermicas y no normozoospermicas.	131

Tabla 42: Porcentajes de cobertura del DNA presente en los prostasomas para los distintos cromosomas y para el DNA mitocondrial.	132
Tabla 43: Frecuencias genotípicas obtenidas en otros estudios con poblaciones europeas para los polimorfismos analizados en la presente tesis	135
Tabla 44: Registro de estudios que han correlacionado los niveles de actividad catalasa seminal con la calidad espermática	135
Tabla 45: Registro de estudios que han analizado la relación entre el polimorfismo CAT C-262T y diversas patologías	145
Tabla 46: Frecuencias genotípicas del SNP CAT C-262T recogidas en los estudios existentes en relación con la fertilidad masculina	147
Tabla 47: Tabla resumen de los datos más significativos obtenidos en los estudios de proteómica de prostasomas previamente publicados.....	153

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Producción fisiológica de radicales libres en el espermatozoide.....	46
Figura 2: Incremento de la producción de ROS por causas de origen endógeno:	47
Figura 3: Proceso de peroxidación lipídica en cascada generado por los ROS	50
Figura 4: Funcionamiento coordinado de los sistemas antioxidantes enzimáticos seminales	52
Figura 5: Estructura de un exosoma.....	59
Figura 6: Clave de colores proporcionada por el kit OxySperm para la determinación de los niveles de estrés oxidativo en muestras seminales.....	75
Figura 7: Diagramas de cajas y bigotes para las cohortes pacientes y donantes y los parámetros volumen, concentración, motilidad progresiva y morfología	94
Figura 8: Diagramas de cajas y bigotes para las muestras agrupadas en normozoospermicas y no normozoospermicas y los parámetros volumen, concentración, motilidad progresiva, morfología, vitalidad y fragmentación del DNA.....	96
Figura 9: Gráficos de barras que muestran las frecuencias de los distintos genotipos en la población completa para los polimorfismos estudiados	98
Figura 10: Gráficos de barras que muestran las frecuencias genotípicas para los SNPs HOGG1 Ser326Cys y XRCC1 Arg399Gln en las 2 cohortes estudiadas, pacientes infértiles y donantes fértiles.....	100
Figura 11: Forest plot que muestra los odds ratio de padecer infertilidad según genotipos para los SNPs HOGG1 Ser326Cys y XRCC1 Arg399Gln	100
Figura 12: Gráficos de barras que muestran las frecuencias genotípicas para los SNPs SOD Ile58Thr, SOD2 Ala16Val., CAT C-262T y GPX Pro200Leu, y para las variantes nulas de GSTT y GSTM, en las 2 cohortes estudiadas, pacientes infértiles y donantes fértiles	104
Figura 13: Forest plot que muestra los odds ratio de infertilidad para los distintos genotipos de los SNPs SOD Ile58Thr, SOD2 Ala16Val., CAT C-262T y GPX Pro200Leu, y para las variantes nulas de GSTT y GSTM	105
Figura 14: Forest plot que muestra los odds ratios de tener bajos niveles de estrés oxidativo (N1 y N2) para cada genotipo estudiado de los SNPs SOD Ile58Thr, SOD2 Ala16Val, CAT C-262T y GPX Pro200Leu, y dos enzimas de la familia de la GST, GSTT y GSTM.....	108
Figura 15: Gráfico de barras que muestra las frecuencias genotípicas para el SNP CAT C-262T en las 2 cohortes estudiadas, pacientes infértiles y donantes fértiles.....	109
Figura 16: Forest plot que muestra los odds ratio de infertilidad para los distintos genotipos del SNP CAT C-262T.	109
Figura 17: Expresión de la enzima catalasa: geles de actividad y western blot.....	111
Figura 18: Gráfico de dispersión que muestra la correlación entre actividad catalasa y cantidad de enzima catalasa.....	112

Figura 19: Gráfico de barras que muestra los valores medios de actividad catalasa y cantidad de enzima para cada genotipo del SNP CAT C-262T	113
Figura 20: Gráficos de cajas y bigotes que muestran los valores de actividad catalasa (izquierda) y concentración de enzima catalasa (derecha) en función del nivel de estrés oxidativo seminal.....	113
Figura 21: Análisis de expresión de la enzima catalasa en base al SNP CAT C-262T.....	114
Figura 22: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de dos pellets de prostasomas: uno proveniente de muestra normozoospermica y otro de no normozoospermica	116
Figura 23: Gráficos que muestran los porcentajes correspondientes a las distintas categorías de anotación Gene Ontology para las proteínas comunes a todos los pooles.....	118
Figura 24: Comparación del contenido proteico de los prostasomas aislados de muestras seminales normozoospermicas con el de prostasomas aislados de muestras seminales no normozoospermicas en términos del porcentaje de proteínas incluidas en las categorías Gene Ontology “función molecular” y “proceso biológico”	123
Figura 25: Comparación del contenido proteico de los prostasomas aislados de muestras seminales normozoospermicas con el de prostasomas aislados de muestras seminales no normozoospermicas en la que se muestran aquellas categorías Gene Ontology para las que existe una mayor variación de porcentaje entre ambos tipos de prostasomas	123
Figura 26: Heat-map que muestra los patrones de expresión proteica para aquellas proteínas con diferencias de expresión entre prostasomas de muestras normozoospermicas y no normozoospermicas.....	124
Figura 27: Red de interacciones entre las proteínas subexpresadas en prostasomas aislados a partir de muestras no normozoospermicas.....	127
Figura 28: Diagrama que representa las rutas metabólicas de producción de energía presentes en el espermatozoide resaltando aquellas enzimas con expresión diferencial en nuestro estudio.....	128
Figura 29: Validación por pooles de la expresión en prostasomas de las proteínas HK1 y LDHC mediante western	129
Figura 30: Validación por muestras de la expresión en prostasomas de las proteínas HK1 y LDHC mediante western	130
Figura 31: Variaciones de expresión de las proteínas HK1 y LDHC presentes en los prostasomas en función de la calidad de la muestra seminal según los resultados obtenidos mediante western blot	130
Figura 32: Perfiles de DNA presente en los prostasomas observados mediante el sistema BioAnalyzer.....	131
Figura 33: Promotor de la enzima catalasa.	144
Figura 34: Funcionamiento del factor de transcripción Nrf2.....	149

Figura 35: a) Diagrama de Venn para comparar el número de proteínas identificadas en nuestro estudio y en los estudios de Utleg *et al.*, Poliakov *et al.*, Ronquist *et al.* y Yang *et al.*. b): Diagrama de Venn comparando el número de proteínas identificadas entre nuestro estudio y los de Ronquist *et al.* y Yang *et al.*153

Figura 36: Comparación entre nuestro estudio y los estudios de Utleg *et al.*, Poliakov *et al.* y Ronquist *et al.* en cuanto al porcentaje de los principales tipos de proteínas identificadas según la clasificación Gene Ontology155

ABREVIATURAS

4HNE: 4-hydroxyl-2-nonenal

8-OHdG: 8-hidroxi-2-deoxiguanosina

AK1: Adenilato kinasa

APE1: Apurinic/apyrimidinic endonuclease

APRT: Adenina fosforribosiltransferasa

APS: Persulfato amónico

CMPK1: Cistidina/Uridina monofosfato kinasa

BER: Base Excision Repair System

CAT: Catalasa

cDNA: DNA complementario

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EVs: Vesículas extracelulares

FSH: Hormona foliculoestimulante

GLUT3: Transportador de glucosa 3

GPX: Gltación peroxidasa

GST: Glutación S transferasa

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HK1: Hexokinasa 1

ICSI: Intracytoplasmic Sperm Injection

IMSI: Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection

IVF: Fecundación In Vitro

LDHC: Lactato deshidrogenasa C

LH: Hormona luteinizante

miRNAs: micro RNA

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

O2-: Ión superóxido

OGG1: Oxoguanosina glicosilasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

P1: Protamina 1

P2: Protamina 2

PARP: Poli(ADP)ribosa polimerasa

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PLA2: Fosfolipasa A2

PRDX: Peroxirredoxina

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

RFLP: Restriction fragment Length Polymorphism

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

rRNA: RNA ribosomal

RT: Temperatura ambiente

SCD: Sperm Chromatin Dispersion Assay

SDS: Dodecil sulfato sódico

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SOD2: Superóxido dismutasa 2

TEM: Microscopio electrónico de transmisión

TFA: Ácido trifluoroacético

TRA: Técnicas de Reproducción Asistida

XRCC1: X-ray repair cross complementing group 1

ZP: Zona Pelúcida

RESUMEN

La infertilidad, definida por la OMS como la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas, es un problema que en países desarrollados afecta a un 14% de las parejas. Hasta ahora el abordaje del varón infértil se ha centrado fundamentalmente en el análisis del seminograma (concentración espermática, motilidad y morfología). Sin embargo, cada vez más estudios apuntan a la necesidad de actualizar este abordaje incluyendo nuevos biomarcadores moleculares de infertilidad masculina más específicos y más adecuados a la evolución actual tanto de la infertilidad masculina propiamente dicha como de las técnicas de reproducción asistida.

En esta tesis se ha partido de dos aspectos de la infertilidad masculina que recientemente han suscitado gran interés entre la comunidad científica especializada en el campo, el estrés oxidativo como fuente de daño en el espermatozoide y la presencia de prostasomas en el eyaculado, estableciéndose como objetivo generar la búsqueda de biomarcadores que permitan relacionar estos dos aspectos con la infertilidad masculina.

En relación con el estrés oxidativo como fuente de daño en el espermatozoide, se ha llevado a cabo una búsqueda de marcadores a nivel genético, analizando la relación existente entre una serie de polimorfismos localizados en genes codificantes para enzimas antioxidantes (SOD2, CAT, GPX1, GSTs) y de reparación del daño en el DNA (OGG1, XRCC1), y la presencia de infertilidad. Para el SNP CAT C-262T el genotipo CC se relacionó con un aumento de la probabilidad de presentar infertilidad (OR = 2.262, IC 95% = 1.369 - 3.733; P = 0.001) mientras que el genotipo CT se asoció con un efecto protector (OR = 0.401; IC 95% = 0.241 - 0.667; P = 0.001). Para el polimorfismo XRCC1 Arg399Gln el genotipo Arg/Arg se asoció con un aumento de la probabilidad de presentar infertilidad (OR = 2.223, IC 95%=1,296-3.813; P=0.003), y el heterocigoto Arg/Gln muestra un efecto protector frente a la infertilidad (OR =0.555; IC 95%=0.337-0.912; P=0.019)

Por otra parte, también se ha realizado un análisis comparativo, cualitativo y cuantitativo, del contenido proteómico de prostasomas presentes en el plasma seminal de varones normozoospermicos y no normozoospermicos, determinándose que estos últimos presentan patrones de subexpresión proteica para 54 proteínas con funciones relevantes en los procesos reproductivos, incluyendo 7 de proteínas que forman parte de las rutas de producción de energía en el espermatozoide (LDHC, GLUT3, HK1, APRT, AK1, PNP y CMPK1). Además, se ha realizado un análisis preliminar comparativo de la carga de DNA de los prostasomas, determinándose que los prostasomas aislados a partir de eyaculados no normozoospermicos presentan una cobertura de DNA mitocondrial un 10% inferior a los normozoospermicos.

Los polimorfismos genéticos tipo SNP presentes en genes como la catalasa y el gen XRCC1, junto con las variaciones en los niveles de algunas proteínas presentes en los prostasomas pueden tener una correlación relevante con la fertilidad masculina y, por lo tanto, podrían ser de gran utilidad como biomarcadores del estado de fertilidad.

SUMMARY

Infertility, which is defined by the OMS as an incapacity to achieve a pregnancy after 12 months of unprotected sexual intercourse, is a major problem affecting 14% of the couples in developed countries. Traditionally, male factor infertility in clinical settings has been studied through the sperm analysis giving special attention to parameters such as sperm concentration, motility and morphology. However, there is growing evidence regarding the need of an update of the method to include new biomarkers of male infertility adequate to the new aspects of male infertility itself and to the evolution of assisted reproduction techniques.

From this situation, the aim on the current thesis was to identify new biomarkers of male infertility. To achieve this goal two aspects of male infertility that have gained attention in the last years were selected as a source of biomarkers: oxidative stress as a cause of sperm damage and seminal plasma prostasomes.

On the one hand, oxidative stress was used as a source of genetic markers of male infertility. The correlation of several polymorphism located in genes codifying for antioxidant (SOD2, CAT, GPX1, GSTs) and reparation enzymes (OGG1, XRCC1) and male infertility was determined. Statistically significant differences between patients and donors were found for SNPs CAT C-262T and XRCC1 Arg399Gln. For SNP CAT C-262T, the CC genotype was associated with an increased risk of male infertility (OR = 2.262, IC 95% = 1.369 - 3.733; P = 0.001) while the CT genotype was associated with a protective effect against infertility (OR = 0.401; IC 95% = 0.241 - 0.667; P = 0.001). For SNP XRCC1 Arg399Gln, the Arg/Arg (OR = 2.23, IC 95%=1,296-3.813; P=0.003) genotype was associated with an increased risk of male infertility while the Arg/Gln genotype was associated with a protective effect against infertility (OR =0.555; IC 95%=0.033-0.912; P=0.019).

On the other hand, a proteomic comparative qualitative and quantitative analysis of the proteomic content of prostasomes isolated from normozoospermic and non normozoospermic seminal samples was performed. The latest showed a pattern of protein underexpression for 54 proteins, including several proteins with relevant functions in reproduction as well as 7 proteins from the sperm energy production pathways (LDHC, GLUT3, HK1, APRT, AK1, PNP y CMPK1). Moreover, a preliminary comparative study of the prostasomas DNA cargo showed that prostasomas from non normozoospermic men have a 10% lower coverage of mitochondrial DNA than those from normozoospermic men.

SNPs present in genes such as catalase or XRCC1 as well as variations in the prostasomal proteomic cargo may have a relevant correlation with male infertility and thus may be of great utility as male fertility biomarkers.

INTRODUCCIÓN

1) Enfoque tradicional del estudio de la infertilidad masculina

1.1) Definición de infertilidad

De acuerdo con el Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1) se entiende infertilidad como enfermedad del sistema reproductivo definida como la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas.

Actualmente la infertilidad es una enfermedad que se estima que afecta entre el 15-20% de las parejas en edad reproductiva. Más de 45 millones de parejas en todo el mundo se ven afectadas por la infertilidad, y más del 40% de estos casos incluyen algún componente de la infertilidad masculina. Se estima que, a escala mundial, hasta el 12% de los hombres (> 30 millones) tendrán problemas de fertilidad durante su vida (2).

Se considera que de las parejas que acuden a la consulta de reproducción por un problema de infertilidad aproximadamente el 50% presenta factor masculino y que de ese 50% el 30% presenta exclusivamente factor masculino, quedando el femenino descartado en este último grupo (3).

1.2) Abordaje clínico actual del varón infértil

El abordaje clínico es el conjunto de pruebas y estudios que se realizan a un paciente dentro de cualquier disciplina médica para encontrar una explicación a su padecimiento y poder así proponer un posible tratamiento. En el campo de la reproducción asistida, cuando una pareja acude a consulta con un cuadro de infertilidad, se realiza un estudio exhaustivo de ambos miembros de la pareja para buscar la causa de esa situación de infertilidad y poder así proponer el tratamiento más adecuado para que la pareja consiga un embarazo.

En el caso del varón infértil, el abordaje clínico actual comprende una revisión de su historia clínica, un estudio hormonal, una exploración física y la realización de al menos dos seminogramas.

- Revisión de la historia clínica del paciente en busca de:
 - Antecedentes médicos que puedan tener relación con la fertilidad: buscar enfermedades de la infancia y/o pubertad (por ejemplo criptorquidia, traumatismos, enfermedades de transmisión sexual, paperas...) y/o cirugías previas que puedan haber afectado al aparato genital o a la fertilidad actual.
 - Enfermedades crónicas que pueden afectar a la función reproductiva, como la diabetes mellitus o ciertas enfermedades oncológicas (por ejemplo cáncer testicular).
 - Tratamientos actuales: existen determinados fármacos que pueden afectar a la eyaculación o a la espermatogénesis, por ejemplo la quimioterapia.

- Exposición a gonadotoxinas: las gonadotoxinas son compuestos tóxicos que afectan al funcionamiento de las gónadas y que por tanto afectan al funcionamiento del aparato reproductivo y a la calidad seminal. Al evaluar al varón infértil hay que descartar la exposición del mismo a compuestos gonadotóxicos: i) farmacológicos (especialmente compuestos antitumorales y radioterapia) ii) contaminantes (pesticidas, ftalatos...) o iii) otras sustancias gonadotóxicas (tabaco, drogas, exceso de consumo de alcohol, esteroides).
- Estudio hormonal: fundamentalmente se determinan los perfiles de las hormonas luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH) y testosterona. Esta determinación es especialmente importante en casos de oligozoospermias severas y azoospermias ya que permite diferenciar entre hipogonadismo hipogonadotrófico (LH y FSH bajas por fallo de secreción de las mismas en el eje hipotálamo-hipófisis), hipogonadismo hipergonadotrófico (LH y FSH normales pero baja secreción de testosterona a nivel testicular) y azoospermias obstructivas (los niveles hormonales y la producción de espermatozoides son normales pero estos no se liberan correctamente en el eyaculado por existir algún tipo de obstrucción física en el aparato reproductivo).
- Exploración física: permite descartar malformaciones que interfieran en la producción y/o liberación del semen (por ejemplo criptorquidia, varicocele, anomalías en el epidídimo o los conductos deferentes...).
- Seminograma: análisis de una muestra seminal para valorar la calidad espermática y descartar la presencia de infecciones importantes en el tracto genito-urinario.

1.3) El seminograma clásico

El seminograma es la piedra angular del estudio del varón infértil y consiste básicamente en la valoración macroscópica y microscópica de una muestra seminal. Este procedimiento se utiliza en todas las clínicas de reproducción y su importancia es tal que desde el año 1980 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estandarizado el procedimiento en su Manual de Laboratorio para el Análisis de Semen Humano (4). Dicho manual incluye tanto los protocolos para realizar las distintas valoraciones que comprende el seminograma como los valores referencia para cada uno de los parámetros. Además, este manual se ha ido adaptando a las variaciones sufridas en la calidad seminal a lo largo de los años, habiéndose publicado ya 5 ediciones (1980, 1987, 1992, 1999, 2010) con nuevos valores referencia actualizados (ver **Tabla 1**).

De acuerdo con dicho manual para valorar la calidad seminal de un varón se debe realizar un primer seminograma diagnóstico; si en el análisis de este primer seminograma aparece alguna anomalía se deberá realizar un segundo seminograma unas tres semanas después para confirmar el diagnóstico (5). Este segundo seminograma resulta de importancia capital para poder distinguir entre una anomalía pasajera en el seminograma como por ejemplo la que puede causar un estado gripal con cuadro febril

ocurrido en días previos a la realización del primer seminograma y una anomalía permanente con repercusión sobre la fertilidad del varón.

Para realizar el seminograma el paciente debe suministrar al laboratorio una muestra seminal recogida mediante masturbación en un frasco estéril después de un periodo de abstinencia sexual de entre 2 y 7 días. La muestra ha de entregarse en el laboratorio en menos de una hora desde que es recogida y habiéndola mantenido a 37°C y en oscuridad por lo que la recomendación es que se recoja directamente en las habitaciones habilitadas para tal fin en las clínicas de reproducción.

Una vez la muestra está en el laboratorio se dejará en la estufa a 37°C durante 30 min, tiempo necesario para que la muestra licue. A partir de ahí se tomará la muestra y se realizarán las siguientes valoraciones (6), (7):

- Volumen (mL): la OMS recomienda que se determine mediante pesada.
- pH: con tiras de pH de gradación de 6-10.
- Concentración (millones/mL): la OMS recomienda utilizar la cámara de Neubauer si bien la cámara Mackler también goza de gran popularidad.
- Motilidad (%): se observa la muestra al microscopio y se determina el porcentaje de espermatozoides i) móviles progresivos, ii) móviles no progresivos y iii) inmóviles.
- Vitalidad (%): se puede determinar tanto con el uso de colorantes supravitales (eosina-nigrosina, fluorocromos, etc) como mediante métodos hipoosmóticos.
- Morfología (%): mediante tinción de Papanicolau o Diff-Quick.
- Concentración de leucocitos en el caso de que esta sea anormalmente elevada (posible leucocitospermia) ya que es un indicativo de la presencia de infecciones en el tracto genito-urinario.

Una vez completado el seminograma, los valores obtenidos para cada parámetro se comparan con los valores referencia definidos por la OMS en su Manual de Laboratorio para el Análisis de Semen Humano (ver **Tabla 1**) y se emite un diagnóstico utilizando los términos propuestos por la OMS para indicar cada una de las posibles patologías o anomalías que puede presentar la muestra seminal. Así, la muestra seminal puede ser catalogada como:

- Normozoospermica: eyaculado normal para todos los parámetros en base a los valores referencia de la OMS.
- Oligozoospermica: eyaculado que presenta una concentración de espermatozoides por debajo de 15 mill/ml.
- Criptozoospermica: eyaculado en el que no se ven espermatozoides al microscopio pero se logra recuperar unos pocos tras centrifugar.
- Azoospermica: eyaculado sin espermatozoides.
- Astenozoospermica: eyaculado con una motilidad por debajo de 40% de espermatozoides móviles y/o de 32% de móviles progresivos.

- Teratozoospermica: eyaculado con un porcentaje de espermatozoides con morfología normal inferior al 4%.
- Necrozoospermica: eyaculado que presenta un porcentaje de espermatozoides vivos inferior al 58%.
- Hipospermica: eyaculado con un volumen inferior a 1.5 mL.
- Hiperespermica: eyaculado con un volumen superior a 7 mL.
- Aspermica: ausencia de eyaculado.
- Leucocitospermica: eyaculado que presenta más de 1 millón de leucocitos por mililitro.

Parámetro	Valor referencia
Volumen (mL)	1,5
Concentración (mill/mL)	15
Movilidad total (%)	40
Movilidad progresiva (%)	32
Vitalidad (%)	58
Morfología (%)	4

Tabla 1: Valores referencia incluidos en el último Manual de Laboratorio para el Análisis de Semen Humano de la OMS (2010). Muestras con valores por debajo de éstos se considerarán patológicas.

2) Nuevos aspectos de interés en el estudio de la infertilidad masculina

2.1) Controversia respecto al uso del seminograma clásico

Aunque el uso del seminograma como parte central del estudio del varón infértil está ampliamente aceptado, en los últimos tiempos la comunidad científica se está replanteando la idoneidad de la aplicación exclusiva de este procedimiento. Diversos estudios apuntan hacia la necesidad de revisar la estructura del seminograma aplicado actualmente e introducir nuevos parámetros que lo actualicen y completen ya que el análisis rutinario de semen no mide el potencial de fertilización de los espermatozoides y los cambios complejos que ocurren en el tracto reproductivo femenino antes de la fertilización (8), (9), (10).

Uno de los principales problemas que presenta el seminograma actual es que ninguno de los parámetros evaluados permite determinar la funcionalidad real del espermatozoide para lograr un embarazo. Para que un espermatozoide sea efectivo a la hora de lograr una fecundación son necesarios 3 requisitos: i) que la cabeza del mismo contenga DNA y que este sea correctamente empaquetado, ii) que la pieza intermedia tenga las herramientas necesarias para generar energía y iii) que el flagelo sea capaz de transformar dicha energía en movimiento (11). Los parámetros que se miden en el seminograma actual no alcanzan a valorar todos estos aspectos.

Por otra parte, varios estudios han concluido que los principales parámetros incluidos en el seminograma clásico (concentración, motilidad y morfología) tienen una capacidad limitada como predictores de fertilidad. Así, el análisis de semen basado en factores

espermáticos tales como la morfología, la concentración, la motilidad, etc., no es del todo preciso para identificar problemas de infertilidad en el 30% -50% de los pacientes (12), (13). En concreto, se ha demostrado que, si bien valores para estos parámetros por debajo de los valores referencia de la OMS indican con bastante certeza la presencia de un problema de infertilidad, existe un rango de valores para estos parámetros, directamente por encima de los valores referencia de la OMS, dentro de los cuales resulta difícil determinar si el paciente es o no fértil/infértil (14), (15), (16). De este modo, valores de concentración entre 13 y 34 mill/mL, de motilidad total entre el 32 y el 52% y de morfología entre el 4 y el 10% no permitirían discriminar con exactitud entre fertilidad e infertilidad (17).

Además, también se ha demostrado que los parámetros incluidos en el seminograma actual presentan una alta variabilidad intraindividuo. En un estudio con 20 pacientes sanos la variabilidad intraindividuo a lo largo de 10 semanas osciló entre el 10.3% y el 26.8%; de los cuatro principales parámetros incluidos en el seminograma clásico la concentración fue el parámetro que presentó la mayor variabilidad intraindividuo, seguida de la morfología y la motilidad y siendo la viabilidad el más estable (18). Esto implica que no se puede utilizar el resultado de un único seminograma para determinar la capacidad reproductiva de un varón (19). Si bien la OMS ya tiene esto en cuenta en su manual al recomendar realizar dos seminogramas antes de llegar a una conclusión definitiva, parece que resultaría de gran utilidad introducir parámetros que presentaran poca o ninguna variación intraindividuo, por ejemplo parámetros genéticos.

Por otro lado, también es sabido que ninguno de los parámetros incluidos en el seminograma actual explica el origen último de la infertilidad en el varón. Los parámetros analizados actualmente permiten determinar la presencia de deficiencias en el producto, que es la muestra seminal, pero no explican cuándo ni por qué se produjeron dichas deficiencias. Ejemplo de esta situación es el caso del diagnóstico de azoospermia que se realiza a la vista de un eyaculado sin espermatozoides pero que no explica si esta situación está ocurriendo por causas secretoras u obstructivas. Esto dificulta la posibilidad de aplicar o en su defecto desarrollar algún tipo de terapia para mejorar la calidad espermática (8). Cada vez existe mayor unanimidad en la idea de que, con el avance de la sociedad, los hábitos de vida poco saludables y la exposición a contaminantes juegan un papel muy importante en la aparición de problemas de infertilidad y espermatogénesis defectuosas; por ello desde hace unos años se está empezando a valorar la necesidad de incluir en el seminograma y/o estudio del varón infértil nuevos parámetros que valoren la capacidad de defensa del varón infértil contra dichos factores ambientales, especialmente parámetros relacionados con la defensa antioxidante.

Otro punto en contra del seminograma aplicado actualmente es que la muestra seminal completa analizada poco tiene que ver con la pequeña subpoblación de la misma que alcanzaría la trompa de Falopio. Además, los valores obtenidos en el laboratorio

siempre serán ligeramente inferiores a los valores reales que se obtendrían si se pudiese analizar la muestra que es depositada en la vagina durante el acto sexual natural; esto se debe a que la propia manipulación de la muestra en el laboratorio produce un daño sobre la misma, especialmente a nivel oxidativo. Por ello se han desarrollado nuevos test que valoran mejor la funcionalidad espermática y que se exponen en el siguiente apartado

Además de lo anterior, otro factor que los científicos critican respecto a la aplicación del seminograma clásico es que este no se ha adaptado a la evolución que han sufrido las técnicas de reproducción asistida.

2.2) Nuevos tests de funcionalidad espermática

Si bien cuando se inició el campo de la reproducción asistida se empleaban fundamentalmente las técnicas de inseminación intrauterina y fecundación in vitro, con el paso de los años cada vez está aumentando más el uso de la técnica de inseminación intracitoplásmica, llegando esta última a ser casi de uso exclusivo en pacientes con oligozoospermias severas y criptozoospermias. Con la aplicación de esta técnica, en la cual un único espermatozoide es seleccionado por el embriólogo e introducido artificialmente en el óvulo, se eluden la mayoría de los pasos que tienen lugar en una fecundación natural y parámetros como concentración o motilidad espermática pierden completamente su importancia (20). Otro sistema que parece que está teniendo buena aceptación es la utilización de la técnica IMSI (Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection) en sustitución de la técnica ICSI; la técnica IMSI es una modificación de la técnica ICSI en la cual en lugar de utilizar el micromanipulador tradicional con 200-400 aumentos se emplea un micromanipulador con 6000 aumentos lo cual permite observar con mayor precisión el interior de la cabeza del espermatozoide llegando a observarse la presencia de vacuolas (21). Diversos estudios han demostrado que el uso de la técnica IMSI mejora tanto los porcentajes de implantación como los de embarazo clínico a la vez que reduce los ratios de aborto (22), (23).

La aplicación masiva de estas técnicas morfológicas plantea la necesidad de introducir nuevos parámetros que permitan valorar el estado del núcleo del espermatozoide ya que al sortear los sistemas naturales de selección espermática aumenta el riesgo de introducir genomas paternos defectuosos. Por ello es necesario complementar estas técnicas con pruebas que estén más relacionadas con la funcionalidad del espermatozoide

Los tests de funcionalidad espermática son un conjunto de pruebas que se están desarrollando para valorar nuevos parámetros en la muestra de semen que den una idea más exacta de la funcionalidad real del espermatozoide y de su potencial fértil.

Un test de funcionalidad espermática debería cumplir con tres requisitos (6):

- Diagnosticar una disfunción espermática concreta.

- Ser un indicador de las tasas de fertilidad y/o embarazo esperables.
- Tener capacidad de orientar respecto a la aplicación de algún tratamiento que mejore la disfunción.

Dentro de los tests de funcionalidad espermática en los que se está trabajando actualmente (ver **Tabla 2**) probablemente los que más aceptación estén teniendo sean los tests de evaluación de la integridad del DNA espermático y los tests de valoración del estrés oxidativo en la muestra seminal (24), motivo por el que en esta tesis también se ha trabajado sobre estos aspectos y se ha evaluado el nivel de fragmentación y de estrés oxidativo además de los parámetros del seminograma.

Test de funcionalidad espermática	Ventajas	Desventajas
Penetración en el moco cervical	Buena correlación con el éxito de IVF	Difícil obtener el moco cervical
Hiperactivación	Buena correlación con el éxito de IVF	Requiere aparataje específico
Interacción espermatozoide-zona pelúcida (ZP)	Una interacción espermatozoide-ZP defectuosa es predictor de fallo de fecundación	Obtener zona pelúcida presenta complicaciones a nivel logístico y ético
Reacción acrosomal	Buena correlación con el éxito de IVF	Requiere mucho tiempo
Zona free penetration assay	Buena correlación con el éxito de IVF	Requiere el uso de animales de experimentación
Especies reactivas de oxígeno	Correlación con el daño en el DNA y con el estrés oxidativo.	Difícil de evaluar
Fragmentación del DNA espermático		
IMSI	Mejor tasa de implantación	Requiere aparataje específico

Tabla 2: Test de funcionalidad espermática en los que se está trabajando actualmente. Modificado de Pacey 2012 (25).

Actualmente existe una tendencia creciente a explorar el uso de una biopsia líquida mínimamente invasiva para identificar marcadores en una serie de procesos patológicos. Las biopsias líquidas son muy efectivas para la medicina personalizada debido a su capacidad de proporcionar múltiples instantáneas no invasivas de situaciones fisiológicas y/o patológicas relacionadas en este caso con el origen de este fluido (26). El semen es un fluido complejo compuesto por células (esencialmente espermatozoides) y plasma seminal que podría usarse como muestra clínica para la búsqueda de biomarcadores, a modo de biopsia líquida del tracto reproductor masculino. Con el avance actual de las investigaciones científicas, aspectos de la infertilidad masculina que hoy se estudian en los laboratorios de investigación podrán transformarse en un futuro no muy lejano en nuevos tests de funcionalidad espermática usados en la clínica de forma rutinaria. Esto incluye fundamentalmente análisis de genómica, proteómica o

metabolómica del espermatozoide, así como el estudio de la carga de vesículas extracelulares presentes en el plasma seminal. En estos nuevos enfoques se ha centrado esta Tesis Doctoral y se explicaran con más detalle en el apartado 3 de la introducción.

2.3) Fragmentación del DNA espermático

Se entiende como fragmentación del DNA espermático al conjunto de roturas, tanto de cadena simple como de cadena doble, que pueden aparecer en el DNA del espermatozoide. Diversos estudios han demostrado que el daño en el DNA espermático se correlaciona negativamente con las tasas de fecundación, desarrollo embrionario, calidad embrionaria e implantación en IVF y positivamente con el porcentaje de abortos espontáneos (27), aunque parece tener menor importancia en los resultados de ICSI (28), (29). Es por ello que cada vez son más los expertos que consideran que la determinación de los niveles de fragmentación presentes en el DNA espermático debería ser incluida dentro del seminograma clásico.

El daño que se produce en el DNA espermático tiene un impacto directo en la funcionalidad del espermatozoide ya que los espermatozoides no tienen completos los sistemas de reparación del DNA post-espermiogénesis. De este modo, todo aquel daño en el DNA del espermatozoide que no haya sido reparado antes de producirse el espermatozoide maduro así como todo aquel que se produzca después de finalizar la espermatogénesis pasará en el DNA del espermatozoide al ovulo fecundado. Sin embargo, se ha demostrado que los ovocitos y los embriones en los primeros estadios de desarrollo tienen capacidad para reparar el daño en el DNA espermático. Por tanto, el impacto final del daño en el DNA espermático dependerá tanto de la magnitud de éste daño como de la capacidad del ovocito para repararlo (30). A este respecto tres son las posibles opciones por las que puede resolverse dicha situación:

- Daño no compensado: el óvulo no es capaz de reparar el daño en el DNA que viene del espermatozoide y el embrión temprano no logra desarrollarse con éxito produciendo fallos de implantación o abortos tempranos.
- Daño parcialmente compensado: el óvulo repara parcialmente el daño en el DNA del espermatozoide con lo que el embrión consigue implantarse con éxito pero se mantienen delecciones o errores de secuencia produciéndose así una descendencia genéticamente anómala.
- Daño compensado: el óvulo repara el daño proveniente del DNA espermático antes de la primera división con lo cual se obtiene una descendencia normal.

Existen diversos mecanismos por los cuales el DNA espermático puede verse dañado, pudiéndose hablar tanto de causas intrínsecas como de causas extrínsecas (30), (31).

- Causas intrínsecas
- Deficiencias en la recombinación

Los errores producidos durante los procesos de recombinación que tienen lugar durante la espermiogénesis se relacionarían directamente con problemas en la posterior protaminación creando un estado de compactación del DNA espermático deficiente. Esta situación haría que el DNA quedase más susceptible al daño provocado por cualquier agente externo, entre ellos al efecto del estrés oxidativo. Es lo que se conoce como modelo de dos pasos (32).
- Protaminación defectuosa

Las protaminas son proteínas nucleares específicas del espermatozoide que presentan un núcleo central rico en arginina y una alta concentración de residuos de cisteína (33). El núcleo de argininas aporta a las protaminas una alta carga positiva que hace que su unión al DNA, que presenta carga negativa, sea muy fuerte y estable. Por su parte los residuos de cisteína facilitan la formación de múltiples puentes disulfuro intra e interprotaminas, necesarios para lograr la alta compactación del DNA espermático. Las protaminas sustituyen a las histonas durante la espermiogénesis permitiendo así una mayor compactación del núcleo del espermatozoide; se estima que aproximadamente el 80% de las histonas son reemplazadas por protaminas. Las principales funciones de las protaminas son (34): i) Condensación del genoma del espermatozoide hasta obtener un núcleo más pequeño e hidrodinámico lo cual facilita el movimiento del espermatozoide. ii) Proteger el genoma paterno al hacerlo inaccesible para nucleasas u otros agentes externos. iii) Competir con y eliminar a factores de transcripción y otras proteínas del genoma de la espermátida obteniendo así un genoma paterno en blanco sin información epigenética que pueda ser fácilmente reprogramado por el ovocito. iv) Actuar ellas mismas como marcadores epigenéticos en algunas regiones del genoma paterno afectando así a su reactivación tras la fecundación. v) También se ha sugerido que podrían actuar como elementos de checkpoint durante la espermiogénesis y/o tener alguna función una vez fecundado el óvulo. El proceso de protaminación del DNA espermático se relaciona doblemente con la fragmentación de dicho DNA: a) Por una parte, el intercambio de histonas por protaminas se lleva a cabo mediante un proceso multifásico cuyo punto central es la formación de roturas temporales en el DNA por la enzima topoisomerasa II; si este proceso no se realiza correctamente, parte de las roturas temporales pueden no ser reparadas y aparecer registros de ese daño no reparado en el DNA del espermatozoide maduro. b) Por otra parte los dos tipos de protaminas, P1 y P2, se añaden al DNA espermático en proporción 1/1; se ha demostrado que proporciones P1/P2 anormalmente altas o anormalmente bajas están directamente relacionadas con mayores niveles de fragmentación en el DNA espermático (35-38).

- Estrés oxidativo

El estrés oxidativo generado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) está considerado junto a la protaminación defectuosa como una de las principales causas de aparición de daño en el DNA espermático. En concreto, el estrés oxidativo es el causante de la oxidación del DNA con la consiguiente aparición de bases aductos de DNA, la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OhdG), producto altamente mutagénico del estrés oxidativo que de no ser escindido provoca una transversión de G:C a T:A durante la replicación del DNA. La aparición de este tipo de bases modificadas tiene gran importancia en la aparición de fragmentación en el DNA espermático puesto que al no contar el espermatozoide con todas las enzimas de la ruta que se encarga de repararlas, la ruta Base Excision Repair System (BER), su reparación queda sin terminar apareciendo sitios abásicos en el DNA.

- Apoptosis abortiva

Durante la espermatogénesis las células de Sertoli llevan a cabo un cribado exhaustivo de las células germinales que salen de los procesos mitóticos y entran en meiosis I. Como consecuencia de este screening en torno a un 60% de dichas células son marcadas para ser eliminadas mediante procesos apoptóticos. Concretamente, las células germinales defectuosas son marcadas mediante ligandos tipo Fas y su destino teórico sería ser fagocitadas y eliminadas por las propias células de Sertoli (39). Sin embargo, este mecanismo no siempre se lleva a cabo de manera eficiente, sino que porcentajes variables de las células germinales llevan a cabo procesos apoptóticos abortivos en los cuales el DNA nuclear es parcialmente degradado pero la célula germinal mantiene su capacidad de diferenciación hacia espermatozoides maduros que en algunos casos pueden ser funcionales. De hecho, el equipo de Burrello *et al.* ha demostrado que no existe una relación directa entre el estado genómico de la célula y la remodelación que se produce hasta obtener el espermatozoide maduro de modo que se puede encontrar en la muestra seminal espermatozoides con el núcleo alterado por procesos apoptóticos abortivos pero con una morfología completamente normal (40). Estos procesos apoptóticos abortivos también explican la presencia de marcadores apoptóticos como Fas, Bcl-x, p53 o anexina 5 en espermatozoides maduros del eyaculado (41, 42) .

- o Causas extrínsecas

- Edad

Aunque no existe consenso, algunos estudios indican que la fragmentación en el DNA espermático aumentaría con la edad, especialmente a partir de los 35 años (43), (44), (45), (46).

- Tiempo de abstinencia
Parece que tiempos de abstinencia cortos (menos de 24h) se relacionarían con una menor fragmentación en el DNA espermático (47), (48).
- Tiempo post eyaculación
La fragmentación en el DNA espermático no es un parámetro estático sino que se ha demostrado que aumenta con el tiempo tras la eyaculación por lo cual actualmente se considera un parámetro dinámico (49).
- Manipulación durante los procedimientos de ART
Cuando las muestras seminales son manipuladas en las clínicas de reproducción asistida los espermatozoides se ven sometidos a factores ambientales que alteran el nivel de ROS al que están expuestos. Así, por una parte, los espermatozoides se ven expuestos a una mayor producción de ROS por efecto de los gases y la luz de las incubadoras, los procedimientos de centrifugación,... a la vez que se ven privados de parte de sus sistemas antioxidantes al sustituirse el plasma seminal por medio de cultivo (50). Esta situación de estrés acaba provocando daños en el DNA espermático. Por otra parte, se ha demostrado que la criopreservación seminal, aunque de gran utilidad a la hora de preservar la fertilidad, provoca daños en los espermatozoides, entre ellos un aumento de la fragmentación del DNA (51).
- Temperatura del testículo
Los espermatozoides se producen en los testículos los cuales se encuentran dentro de la bolsa escrotal en una posición externa al cuerpo. Esto logra que la temperatura del testículo sea en torno a 6°C inferior a la del resto del cuerpo. Cuando la temperatura testicular sube la calidad espermática se reduce. Ejemplo de ello es la recurrencia de infertilidad masculina en determinadas profesiones en las cuales los testículos están expuestos a temperaturas elevadas de manera repetitiva, como es el caso de camioneros o ciclistas, o en varones obesos (52).
- Varicocele
El varicocele es una patología en la cual se produce una inflamación anormal, palpable y a veces visible de las venas localizadas en torno a los cordones espermáticos. Esta situación afecta a la espermatogénesis por múltiples vías: aumento de la temperatura testicular, cambios en el flujo sanguíneo testicular, presiones venosas a nivel testicular, reflujo de metabolitos renales y adrenales, disfunción hormonal, fenómenos autoinmunes, aumento del estrés oxidativo,... (53) Varios estudios han relacionado la presencia de varicocele con un aumento en los niveles de fragmentación del DNA espermático (54), (55), (56).

- Infecciones bacterianas
Se ha demostrado que pacientes con infecciones genitourinarias por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma* presentan mayores porcentajes de fragmentación en el DNA espermático (57), (58).
- Tratamientos clínicos
Algunos tratamientos médicos se relacionan con una mayor fragmentación en el DNA espermático siendo esta relación especialmente importante en el caso de los tratamientos quimioterápicos (59).
- Exposición a químicos ambientales
Más de 200 compuestos químicos diferentes han sido encontrados en el ser humano como consecuencia de su exposición a ellos en el ambiente; dichos compuestos pueden afectar a la calidad espermática, bien afectando a la funcionalidad testicular o bien pasando al eyaculado donde afectan a los espermatozoides maduros (60). Se ha demostrado que la exposición a compuestos químicos ambientales, ocupacional o no ocupacional, está relacionada con una mayor fragmentación en el DNA espermático. También ha sido demostrado que una exposición continuada a altas concentraciones de contaminación en el aire se relaciona con una mayor fragmentación en el DNA espermático.

Cada vez son más los expertos que consideran que la determinación de los niveles de fragmentación presentes en el DNA espermático debería ser incluida dentro del seminograma clásico con el objeto de tener en cuenta dicho valor a la hora de decidir el procedimiento de reproducción asistida más adecuado para cada paciente. En concreto, se ha propuesto que pacientes con niveles de fragmentación elevados sean derivados directamente a protocolos de ICSI evitando así los costes, tanto económicos como emocionales, de someter a estos pacientes a ciclos de inseminación intrauterina o IVF clásica ya que tienen probabilidades de éxito muy bajas. Además, en muchas clínicas de reproducción asistida ya se ofrece actualmente a pacientes con altos niveles de fragmentación la posibilidad de realizar procedimientos complementarios que reducen los niveles de fragmentación en la muestra al seleccionar la subpoblación más sana como es el caso del uso de columnas de anexina V. Por otra parte, en casos en los que los niveles de fragmentación espermática son extremadamente altos se podría optar por utilizar espermatozoides testiculares ya que estos presentan siempre niveles de fragmentación inferiores a los del eyaculado al no haber estado sometidos a fuentes de daño posttesticulares. Por último, el conocimiento de los niveles de fragmentación espermática del paciente es también un dato que se puede manejar a la hora de valorar el riesgo de introducir un genoma paterno defectuoso con el uso de técnicas de ICSI, informando a aquellos pacientes con niveles de fragmentación muy elevados de esta situación para ofrecerles así la posibilidad de optar por el uso de semen de donante.

2.4) Estrés oxidativo

Se conoce como estrés oxidativo al desbalance entre la producción sistémica de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad biológica celular para detoxificar dichas especies. Las ROS son una serie de radicales y moléculas (ver **Tabla 3**) que se originan como subproductos del metabolismo del oxígeno en las reacciones celulares y que tienen en común poseer al menos un electrón desapareado y ser altamente reactivas.

Radicales	Moléculas
Ion hidroxilo [OH ⁻]	Singlete de oxígeno [¹ O ₂]
Ion superóxido [O ₂ ⁻]	Peróxido de hidrógeno [H ₂ O ₂]
Óxido nítrico [NO]	Acido hipoclorhídrico [HOCL]
Radical peroxilo [RO ₂]	Peróxido lipídico [LOOH]
Peroxilo lipídico [LOO]	Ozono [O ₃]
Radical tiol [RS ⁻]	

Tabla 3: Radicales y moléculas incluidos en los ROS.

En el caso de los espermatozoides, estos se ven sometidos a ROS provenientes de dos fuentes: los que ellos mismos generan y los presentes en el plasma seminal.

La producción de ROS en el propio espermatozoide tiene lugar por dos enzimas independientes: mediante la NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática (NOX5) y mediante la oxidoreductasa NADPH dependiente mitocondrial (ver **Figura 1**). Ambas enzimas emplean como sustrato la molécula NADPH producida en la vía de las hexosas monofosfato del metabolismo de la glucosa y su actividad está por tanto directamente relacionada con los niveles de flujo de glucosa al espermatozoide (61). La principal ROS producida en el espermatozoide es el anión superóxido (O₂⁻), ROS moderadamente reactiva con una vida media muy corta (1 milisegundo). El anión superóxido es entonces convertido en peróxido de hidrógeno, bien de manera espontánea o bien a través de una reacción enzimática catalizada por la enzima superóxido dismutasa. Además, se ha demostrado que la producción de ROS en los espermatozoides se incrementa con la edad a la vez que se reduce la actividad de los sistemas antioxidantes (62), (63).

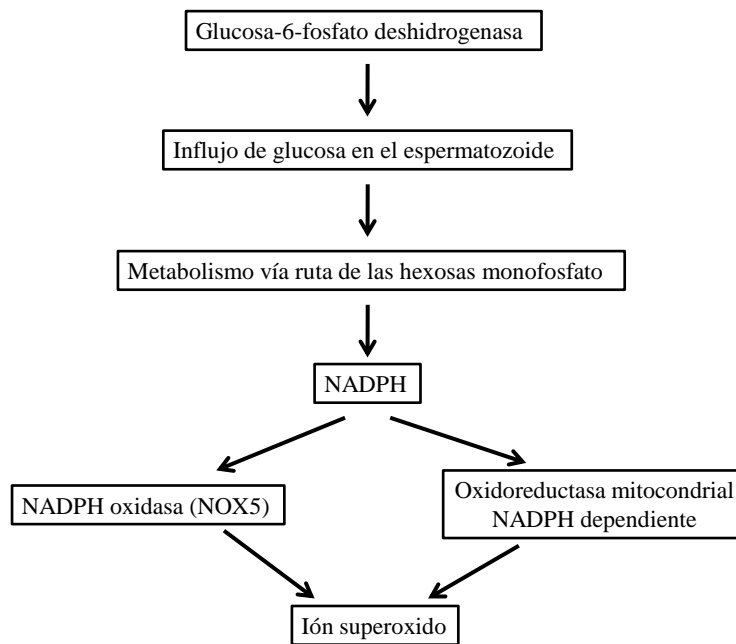


Figura 1: Producción fisiológica de radicales libres en el espermatozoide. Adaptado de Lampiao et al., 2012 (61).

Por su parte, los ROS presentes en el plasma seminal pueden tener un origen endógeno (ver **Figura 2**) o exógeno dependiendo respectivamente de si su aparición se produce por causas relacionadas con el propio funcionamiento del testículo o por otras causas (64).

a) Origen endógeno:

- Leucocitospermia

Se produce cuando la presencia de células positivas para peroxidasa (leucocitos polimorfonucleares y macrófagos) por mililitro en el plasma seminal supera la cantidad de un millón. Estas células se producen mayoritariamente en la próstata y las vesículas seminales y son liberadas al plasma seminal. Una vez en el plasma seminal si son activadas por algún estímulo, como puede ser la presencia de una infección, pueden liberar 100 veces más ROS de lo normal (65), (66).

- Espermatozoides inmaduros

Durante la espermatogénesis los espermatozoides sufren una importante remodelación física y pierden la mayor parte de su citoplasma. En ocasiones, algunos espermatozoides no realizan esta remodelación correctamente y mantienen restos de citoplasma residual, el cual se acumula en torno a su pieza intermedia: es lo que se conoce como la gota citoplásmica. Este tipo de espermatozoides producen una mayor cantidad de ROS de lo normal al hiperactivarse la NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática.

- Varicocele

Es una patología en la cual se produce una inflamación de las venas localizadas en torno a los cordones espermáticos. Se ha comprobado que a mayor grado de varicocele mayor nivel de estrés oxidativo en el plasma (67), (68), (69).

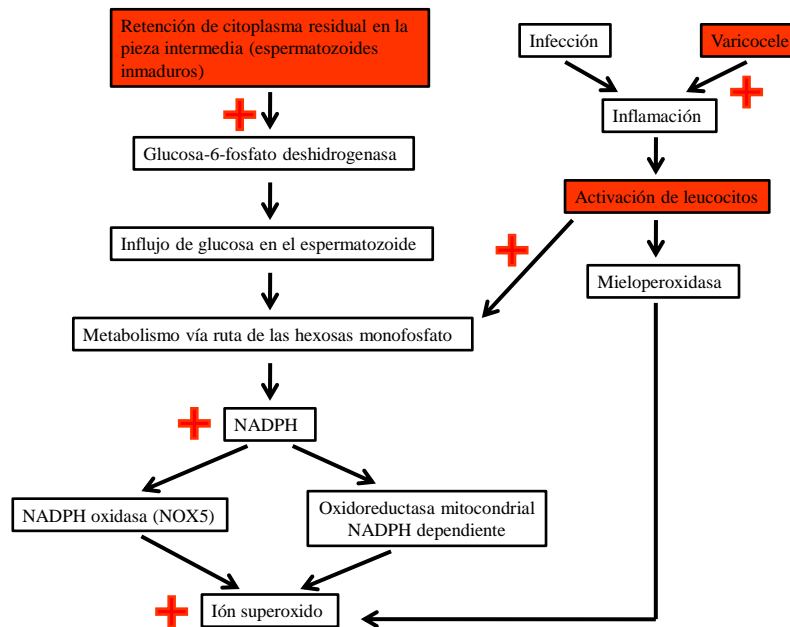


Figura 2: Incremento de la producción de ROS por causas de origen endógeno: leucocitospermia, presencia de espermatozoides inmaduros y varicocele.

b) Origen exógeno:

- Radiaciones

Diversos estudios han relacionado la radiación emitida por los teléfonos móviles con una mayor producción de ROS a nivel testicular (70), (71). Probablemente esto se deba a que dichas radiaciones pueden alterar el flujo de electrones en las membranas celulares (72).

- Toxinas

Se ha relacionado una alta exposición a toxinas en el ambiente, con una mayor presencia de estrés oxidativo en el plasma seminal (73), (74), (75); esto se debe a que este tipo de toxinas se acumula en el organismo. Como ejemplo podemos citar ftalatos, cadmio, cromo o mercurio.

- Tabaco

Varios estudios han demostrado que el plasma seminal de los fumadores presenta un incremento de hasta el 48% en la concentración de leucocitos y de hasta un

107% en la presencia de ROS así como una reducción importante de la concentración de compuestos antioxidantes seminales como son las vitaminas E y C (76), (77).

- Alcohol

Se ha demostrado una mayor presencia de subproductos de la peroxidación lipídica y una reducción en antioxidantes en el plasma seminal de varones alcohólicos.

- Ejercicio físico

Varios estudios han demostrado que la práctica de excesivo ejercicio físico se relaciona con una mayor concentración de ROS en el plasma seminal. Esto se debería a que el metabolismo aeróbico muscular produce grandes cantidades de ROS (78).

- Estrés psicológico

Existen estudios que apuntan a la existencia de una relación entre el estrés psicológico y la presencia de mayores cantidades de ROS y menor capacidad antioxidante en el plasma seminal; se ha sugerido que este efecto se debería a que el estrés psicológico afectaría al flujo de gonadotropinas (79), (80), (81).

- Infecciones

Como ya se ha indicado la presencia de leucocitos en el plasma seminal supone una importante fuente endógena de ROS. Es por ello que la presencia de infecciones en el tracto reproductivo masculino se ha relacionado con un incremento en la concentración de ROS en el plasma seminal debido tanto a la producción de los mismos directamente por los patógenos como a la estimulación de los leucocitos provocada por la infección (82).

- Diabetes

Algunos estudios han demostrado que el semen de varones diabéticos presenta una mayor concentración de ROS que el de varones no diabéticos posiblemente debido a una mayor producción de superóxido a nivel mitocondrial por efecto de la hiperglicemia (83), (84).

- Obesidad

Se ha demostrado que el semen de varones obesos presenta una mayor concentración de ROS que el de varones no obesos; se piensa que esto se podría deber por una parte a que en personas obesas se incrementa la producción de ROS debido al mayor ratio metabólico que muestran y por otra parte a que los sistemas antioxidantes enzimáticos testiculares podrían funcionar peor en varones obesos por el aumento de la temperatura escrotal (85).

Normalmente la presencia de ROS en el plasma seminal esta neutralizada por los sistemas antioxidantes manteniéndose una concentración baja y controlada necesaria para que se lleven a cabo algunos procesos fisiológicos necesarios para la fecundación (86). Estos procesos fisiológicos son 4:

- Capacitación

Proceso que tiene lugar en el útero por el cual el espermatozoide sufre una serie de modificaciones que lo hacen apto para poder fecundar el óvulo. Estas modificaciones incluyen tanto un incremento en la producción de la molécula adenosina cíclica 1,3-monofosfato, parte esencial de varias rutas de activación enzimática y control de la expresión génica, como la modificación de la composición lipídica de la membrana celular en la zona que cubre al acrosoma, con pérdida de colesterol y glucosaminolucanos. Bajas concentraciones de ROS son imprescindibles para que estos cambios se produzcan.

- Hiperactivación

Proceso que tiene lugar en el oviducto por el cual se producen cambios en la motilidad espermática para facilitar el encuentro del espermatozoide con el óvulo. El espermatozoide hiperactivado muestra un movimiento más vigoroso, con movimientos del flagelo más amplios y asimétricos, balanceo de la cabeza y desplazamiento no lineal. Nuevamente se necesitan bajas concentraciones de ROS para que estos cambios tengan lugar.

- Reacción acrosomal

La reacción acrosómica consiste en la fusión de la membrana celular del espermatozoide con la membrana externa del acrosoma lo cual libera el contenido del acrosoma y deja finalmente la membrana interna del mismo expuesta hacia el exterior. Este proceso se inicia cuando el espermatozoide ha logrado atravesar el cúmulo oóforo y se ha unido a la zona pelúcida que recubre al óvulo. El contenido del acrosoma incluye una serie de enzimas hidrolíticas que degradan la zona pelúcida creando un poro por el que el espermatozoide puede acceder hasta contactar con el óvulo. Por su parte, la membrana interna del acrosoma contiene los receptores específicos que reconocerán y se unirán a las proteínas ZP del óvulo, iniciando la fecundación. Para que esta reacción tenga lugar es necesario que se produzcan una serie de eventos de fosforilación proteica e influjo de calcio para los que se necesita una presencia de ROS a baja concentración.

- Fusión espermatozoide-ovocito

Para que la fusión del espermatozoide con el óvulo tenga lugar la fluidez de la membrana del espermatozoide ha de incrementarse. La enzima fosfolipasa A2 (PLA2) tiene un papel esencial en ese proceso ya que modifica la estructura de los grupos triglicéridos de la membrana incrementando su fluidez. Bajas concentraciones

de ROS son necesarias para evitar la desfosforilación e inactivación de la PLA2 durante la capacitación.

Sin embargo, a veces este equilibrio se rompe, bien por una elevada producción de ROS o bien por un fallo en el funcionamiento de los sistemas antioxidantes. En esa situación los niveles de ROS en el plasma seminal aumentan causando peroxidación lipídica, reducción de la motilidad, daño en el DNA e inducción de la apoptosis (87), (88):

- Peroxidación lipídica

Se conoce como peroxidación lipídica al proceso por el cual oxidantes como los radicales libres atacan a lípidos que contienen enlaces dobles carbono-carbono, especialmente a ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Los espermatozoides son especialmente sensibles a este tipo de ataque ya que la membrana espermática es muy rica en ácidos grasos PUFA. Estos ácidos grasos reaccionan fácilmente con los ROS iniciando una cascada de peroxidación lipídica (ver **Figura 3**) en la membrana que provoca cambios en la microarquitectura de esta, produciendo una reducción de la fluidez de la misma, lo cual dificulta la motilidad del espermatozoide y reduce su capacidad para fusionar su membrana con la del óvulo. Además, la peroxidación lipídica libera como subproducto 4-hydroxyl-2-nonenal (4HNE), compuesto altamente reactivo que forma aductos con proteínas del espermatozoide modificando la actividad de las mismas con el consiguiente efecto sobre la fertilidad; entre las proteínas con las que reacciona el 4HNE se encuentran las proteínas mitocondriales lo cual deriva en una estimulación de la producción de ROS a nivel mitocondrial que provoca la activación de procesos apoptóticos.

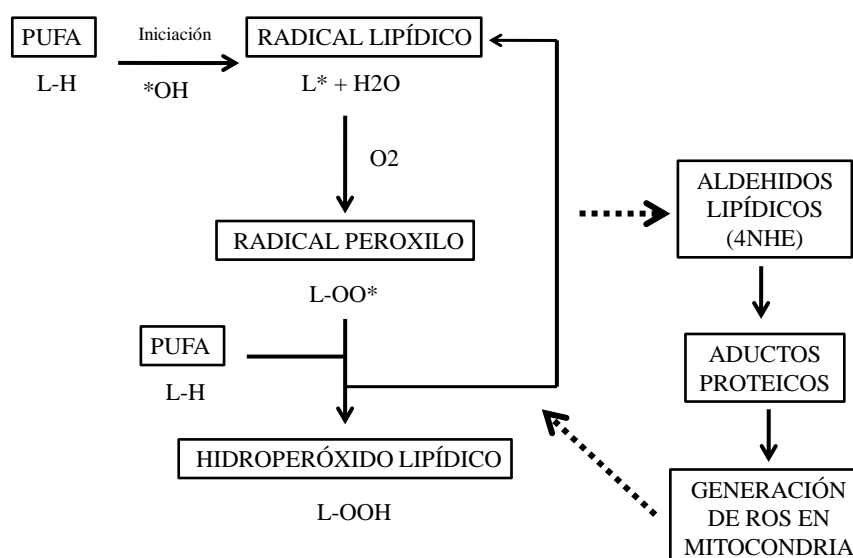


Figura 3: Representación esquemática del proceso de peroxidación lipídica en cascada generado por los ROS.

- Reducción de la motilidad
Se ha comprobado que una alta presencia de estrés oxidativo en el plasma seminal se relaciona con una reducción de la motilidad del espermatozoide aunque no está claro el por qué. Por una parte, parece que la peroxidación lipídica reduciría la fluidez de la membrana rigidificando al espermatozoide y dificultando su movimiento. Por otra parte, algunos estudios apuntan a que la presencia de ROS en el plasma activaría una serie de eventos en el citoplasma del espermatozoide que provocarían cambios en el funcionamiento de algunas enzimas clave y esto último reduciría las actividades de fosforilación en el axonema necesarias para una buena motilidad.

- Daño en el DNA
Los ROS pueden provocar daño en el DNA tanto de forma directa como de forma indirecta, pudiendo llegar a producir fragmentación en el DNA. Así por una parte los ROS pueden reaccionar directamente con el DNA provocando la eliminación de hidrógenos del esqueleto del DNA lo que puede derivar en una rotura de la cadena de DNA durante su reparación. Por otra parte, los ROS también pueden reaccionar directamente con el DNA provocando la formación de aductos de DNA principalmente 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina (8-OhdG), los cuales son reconocidos y eliminados por la primera enzima de la ruta BER (Base Excision Repair System), generándose así sitios abásicos en la cadena de DNA; estos sitios abásicos se mantienen en el espermatozoide maduro ya que este no cuenta con el resto de las enzimas de la ruta BER y tienen un efecto altamente desestabilizador de la estructura del DNA a nivel local que puede resultar en la aparición de roturas en el DNA. Además, el estrés oxidativo también daña indirectamente el DNA tanto a través de los subproductos de la peroxidación lipídica los cuales pueden reaccionar con el DNA como por la inducción de procesos apoptóticos que no lleguen a completarse.

- Inducción de apoptosis
La apoptosis es una respuesta no inflamatoria a determinados estímulos que desemboca en la muerte celular. Altas concentraciones de ROS pueden alterar las membranas mitocondriales provocando la liberación del citocromo C y activando caspasas, induciendo así la entrada en apoptosis.

2.5) Sistemas biológicos de defensa en el espermatozoide

El eyaculado es rico en sistemas biológicos de defensa frente a ataques externos los cuales se pueden clasificar principalmente en dos grandes grupos: sistemas antioxidantes y sistemas de reparación del daño presente en el DNA. Ambos grupos incluyen diversas enzimas para las cuales han sido descritos polimorfismos que muestran relación con la aparición de varias enfermedades. En esta tesis hemos

seleccionado polimorfismos tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en enzimas implicadas en los sistemas antioxidantes y de reparación del DNA con el fin de estudiar su frecuencia en nuestra población y asociarlos con la presencia de infertilidad masculina.

2.5.a) Sistemas antioxidantes

Los sistemas antioxidantes son sistemas biológicos de defensa frente al estrés oxidativo que ayudan a mantener los niveles de ROS estables. Tanto los propios espermatozoides como el plasma seminal contienen un complejo sistema de defensa antioxidante para proteger al espermatozoide que incluye tanto enzimas con actividad antioxidante como moléculas con capacidad antioxidante.

Las enzimas antioxidantes son enzimas que metabolizan los ROS logrando así su eliminación. Espermatozoides y plasma seminal cuentan con una red de enzimas con capacidad antioxidante que incluye superóxido dismutasas, catalasa, glutatión peroxidasas, glutatión transferasas, peroxirredoxinas y tiorredoxinas (89), (90). En condiciones normales todas estas enzimas trabajan de forma coordinada para lograr una eliminación efectiva de las especies reactivas de oxígeno (ver **Figura 4**).

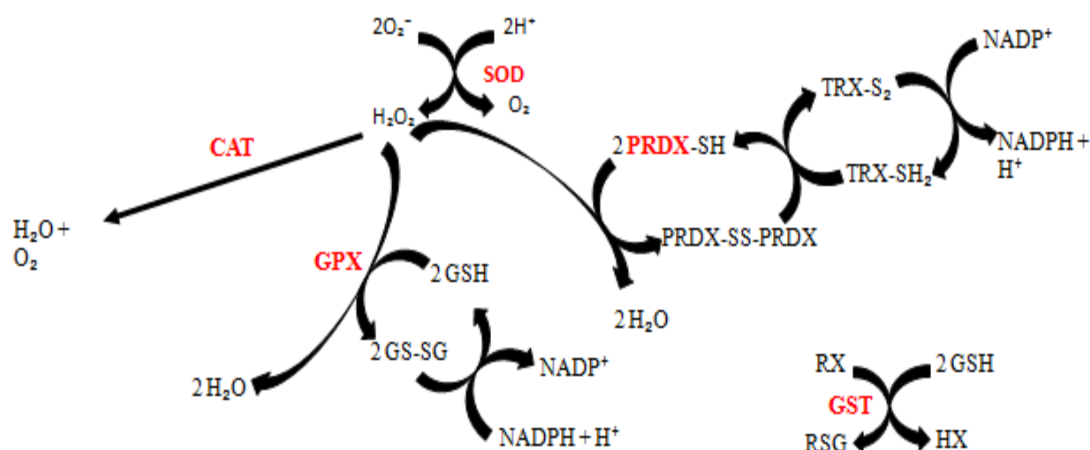


Figura 4: Esquema que muestra el funcionamiento coordinado de los sistemas antioxidantes enzimáticos seminales.

- SOD (superóxido dismutasa)

Enzima antioxidante que cataliza la detoxificación del anión superóxido conjugándolo con hidrógeno y produciendo peróxido de hidrógeno como subproducto (91). Al eliminar el anión superóxido esta enzima evita la producción de radical hidroxilo previniendo así la aparición de procesos de peroxidación lipídica (92). Existen 3 isoformas de la superóxido dismutasa: i) SOD1 o Cu-ZnSOD presente en el citoplasma, ii) SOD2 o MnSOD presente en la mitocondria y iii) SOD3 o Cu-ZnSOD secretada. Aunque la cantidad de estas enzimas presente

en el espermatozoide maduro es muy baja, especialmente la de la SOD1, puesto que el espermatozoide pierde la mayor parte de su citoplasma durante el proceso de maduración, el plasma seminal es rico en las mismas, estimándose que el 75% de la actividad superóxido dismutasa presente en el mismo correspondería a la SOD3 (93). Es importante resaltar que en el caso particular de la superóxido dismutasa parece que niveles de actividad excesivamente elevados son incluso más perjudiciales que niveles de actividad reducidos al provocar un incremento de la producción de peróxido de hidrógeno (94). Concretamente, se ha relacionado una actividad superóxido dismutasa elevada con procesos de espermatogénesis y/o maduración epididimal defectuosa que derivan en la presencia en el eyaculado de espermatozoides inmaduros con restos de citoplasma residual. En este tipo de espermatozoides, al haber mayor cantidad de citoplasma, hay por una parte una mayor cantidad de la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa, con la consiguiente mayor producción de anión superóxido, y por otra una mayor cantidad de enzima SOD1, produciéndose mayor cantidad de peróxido de hidrógeno y aumentando el estrés oxidativo (95).

- CAT (Catalasa)

Codificada en el cromosoma 11p3 es la enzima que se encarga de detoxificar el H_2O_2 convirtiéndolo en H_2O y O_2 (96). En células somáticas esta enzima se localiza fundamentalmente en los peroxisomas por lo que su presencia en espermatozoides es muy reducida al haber perdido estos la mayor parte de su citoplasma. Por el contrario, se ha encontrado una importante concentración de enzima catalasa en el plasma seminal (97), (98). Se ha observado que el plasma seminal de pacientes infértiles presenta una menor actividad de la catalasa y una mayor concentración de H_2O_2 que el de pacientes fértiles (99). Esta presencia de alta concentración de H_2O_2 resulta muy dañina para los espermatozoides ya que provoca peroxidación lipídica reduciendo la fluidez de la membrana. Esto empeora el movimiento de los espermatozoides y dificulta la capacidad de la membrana del espermatozoide para fusionarse con la del óvulo. Se ha observado que una suplementación con catalasa durante la criopreservación del semen mejora tanto la movilidad como la vitalidad de la muestra tras la descongelación (100).

- GPX (Glutación peroxidasa)

La familia de la glutación peroxidasa está compuesta por 8 enzimas cuya actividad principal consiste en eliminar el peróxido de hidrógeno empleando para ello la molécula glutación (101). Además, también pueden reducir el $ONOO^-$ (102), especie reactiva de oxígeno que promueve la nitración de proteínas relacionadas con la motilidad y la capacitación (103). De entre las enzimas de la familia de la glutación peroxidasa, de la GPX1 a la GPX4 son dependientes de selenio mientras que las restantes no lo son (104). Varios estudios han concluido que la única isoforma de la glutación peroxidasa con actividad antioxidante presente en el

espermatozoide y en el plasma seminal es la GPX1 (105). No obstante, se ha demostrado que la GPX4 está presente en el espermatozoide en gran cantidad en la pieza intermedia (supone hasta un 50% de la cantidad total de proteínas presente en esta zona del espermatozoide) aunque en una forma inactiva con función únicamente estructural como parte de la mitocondria (106). Así mismo también se ha descrito la presencia de una isoforma nuclear de la GPX4 que participa en la organización de la cromatina durante la espermatogénesis (107).

- GST (Glutation S transferasas)

Familia de enzimas multifuncionales diméricas citosólicas que conjugan electrófilos tóxicos y otros intermediarios con glutatión eliminando así su toxicidad y facilitando su excreción. Incluye 8 enzimas diferentes nombradas por letras griegas (alpha, mu, kappa, omega, pi, sigma, theta y zeta) siendo de entre ellas la GSTT (theta) y la GSTM (mu) las que parecen tener mayor actividad antioxidante en semen (108). Se ha demostrado la presencia de estas enzimas tanto en los fluidos del testículo y los túbulos seminíferos como en el propio espermatozoide, aunque se piensa que su actividad en plasma seminal no sería extremadamente importante dada la reducida disponibilidad en el plasma seminal de la molécula glutatión necesaria para su actividad. Cabe destacar que existen varios estudios que apuntan a que estas enzimas tendrían también un papel importante en los procesos de unión del espermatozoide a la zona pelúcida del óvulo (109), (110).

- PRDX (peroxirredoxinas)

Familia de peroxidasas tiol dependientes que contienen en su centro activo uno o dos residuos de cisteína imprescindibles para su actividad. La familia de las peroxirredoxinas comprende 6 isoformas que varían en el número de residuos de cisteína presentes en el sitio activo: dos residuos para las peroxirredoxinas 1 a 5 y uno para la peroxirredoxina 6 (111). Cuando el peróxido de hidrógeno se une a la cisteína oxida el radical –SH de esta, liberándose H₂O como producto de la reacción y quedando la enzima oxidada inactiva; es necesaria entonces la actuación de otra enzima complementaria, generalmente una tioredoxina, que vuelva a reducir el radical –SH de la cistina activando así a la peroxirredoxina (112). En el espermatozoide están presentes las seis isoformas de la peroxirredoxina aunque distribuidas de manera diferencial entre los distintos compartimentos subcelulares; se ha demostrado que en todos los compartimentos subcelulares del espermatozoide aparecen al menos 2 isoformas siendo una de ellas la isoforma 6 (113). Esta localización específica de las isoformas de la peroxirredoxina en el espermatozoide podría indicar que estas enzimas poseen algún tipo de actividad complementaria específica de cada isoforma y diferente de la actividad común como antioxidantes. Además, también se ha observado que las peroxirredoxinas 1 y 6 forman complejos de alto peso molecular cuando el espermatozoide se ve expuesto a niveles de estrés oxidativo muy altos. Varios estudios han demostrado

que los espermatozoides de pacientes infértiles presentan cantidades de peroxirredoxinas, especialmente de la 1 y de la 6, inferiores a las que presentan los espermatozoides de donantes fértiles (114), (115).

Además de los sistemas antioxidantes enzimáticos el plasma seminal posee un sistema antioxidante complementario formado por moléculas antioxidantes de bajo peso molecular. Este sistema incluye tanto moléculas como glutatión, ácido pantoténico, coenzima Q10, carnitina o vitaminas A, B, C y E como minerales como cinc, selenio, cobre o cromo (116).

- Glutatión

Molécula azufrada que previene la formación de oxígeno libre, protege a la membrana celular frente a la oxidación lipídica y reconstruye los grupos tiol de proteínas que han sido eliminados previamente por efecto del estrés oxidativo. Se ha demostrado que el déficit de glutatión en el plasma seminal se correlaciona con inestabilidad en la pieza intermedia del espermatozoide y defectos en la motilidad (117).

- Vitamina A

Además de regular la espermatogénesis se ha demostrado que bajas concentraciones de vitamina A en el plasma seminal correlacionan con reducción de la motilidad espermática (118).

- Vitamina C

También llamada ácido ascórbico, es una molécula hidrosoluble cuya concentración en el plasma seminal es 10 veces superior a su concentración en el suero sanguíneo. Presenta una alta capacidad antioxidante y se han relacionado niveles reducidos de la misma en el plasma seminal con mayores concentraciones de ROS y presencia de astenozoospermia (119).

- Vitamina E

También llamada α -tocoferol es un compuesto orgánico liposoluble que se localiza fundamentalmente en las membranas. Protege a las membranas frente al estrés oxidativo inhibiendo la peroxidación lipídica y capturando radical hidroxilo y superóxido (120).

- Selenio

Niveles reducidos de selenio en el plasma seminal se correlacionan con una mayor presencia de espermatozoides con morfología anormal y menor motilidad (121).

La importancia de los sistemas antioxidantes presentes en el plasma seminal es tal que se está valorando la posibilidad de tratar a aquellos pacientes con niveles de estrés oxidativo seminal muy elevado con suplementos de antioxidantes en la dieta con el

objetivo de incrementar la presencia de los mismos en el plasma seminal. Sin embargo, aún no existe un consenso respecto al grado de utilidad de este tipo de tratamiento debido a que no hay uniformidad entre los estudios realizados; a pesar de ello, parece que la administración durante al menos los 3 meses previos a los tratamientos de reproducción asistida de dosis de antioxidantes ligeramente superiores a las recomendadas para una dieta regular resultaría beneficiosa en pacientes con exceso de estrés oxidativo (122), (123), (124).

Por otra parte, también se está trabajando en intentar mimetizar los sistemas antioxidantes seminales naturales en los medios de cultivo empleados en reproducción asistida con el objetivo de mantener una concentración de ROS fisiológica una vez se retira el plasma seminal durante el procesado de las muestras. Así, se han obtenido buenos resultados con medios de cultivo suplementados con vitamina E, glutatión, catalasa... (125). También se ha probado este tipo de suplementación con éxito para los medios de criopreservación (126).

2.5.b) Sistemas de reparación del DNA espermático

En células somáticas la principal ruta empleada para reparar el daño en el DNA generado por el estrés oxidativo es la ruta Base Excision Repair (BER). Esta ruta está organizada fundamentalmente por 3 enzimas: la oxoguanosine glycosylase (OGG1), la apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1) y la X-ray repair cross complementing group 1 (XRCC1). En concreto, la oxoguanosine glycosylase (OGG1) detecta la presencia de los principales aductos de bases del DNA, la 8OhdG, y los elimina generando un sitio abásico. Este sitio abásico es reconocido e hidrolizado por la endonucleasa APE1 permitiendo así el reemplazo de la base purínica o pirimidínica por la polimerasa β asociada a la proteína de andamiaje XRCC1.

A diferencia de las células somáticas, el espermatozoide tiene buena parte de los sistemas de reparación del DNA inactivados. En el caso de la ruta BER (Base Excision Repair System), el espermatozoide únicamente tiene activa la primera enzima de la misma, la OGG1 (127). Esta enzima, presente en el espermatozoide maduro en gran cantidad, reconoce pares de bases 8-OhdG:C y escinde la 8-OhdG, dejando un sitio abásico. Como las siguientes enzimas de la ruta, la APE1 y la XRCC1, ya no están presentes en el espermatozoide maduro, este sitio abásico se mantiene hasta el momento de la fecundación cuando será previsiblemente reparado por la maquinaria de reparación del óvulo. Curiosamente, se ha demostrado que la organización de la ruta BER en el óvulo es casi inversa a la organización de la misma en el espermatozoide: aunque están presentes todas las enzimas de la ruta, la OGG1 lo está en cantidades ínfimas. Es por ello que muchos expertos opinan que esta organización de la ruta BER casi contrapuesta entre el espermatozoide y el óvulo no es fruto de la casualidad, sino que supondría un mecanismo perfectamente preparado para actuar como un primer punto de control postfecundación de la capacidad de coordinación de óvulo y espermatozoide de modo que solamente aquellos cigotos formados por un espermatozoide y un óvulo

“compatibles” serán capaces de reparar con éxito el daño generado en el DNA espermático por el estrés oxidativo.

- 8-OGG1 (8 oxoguanosina glicosilasa)

Codificada en el cromosoma 3p26, es la primera enzima y enzima clave de la ruta BER de reparación del DNA; reconoce pares de bases 8-OhdG:C y escinde la 8-OhdG (128). El 8-OhdG es un producto altamente mutagénico del estrés oxidativo que de no ser escindido provoca una transversión de G:C a T:A durante la replicación del DNA. Se ha comprobado que el semen de pacientes infértiles presenta unos niveles elevados de pares de bases OhdG:C (129).

- APE1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease)

Codificada en el cromosoma 14q11.2 se trata de una enzima endonucleasa que forma parte de la ruta BER de reparación del DNA; concretamente, esta enzima inicia la reparación de los sitios abásicos dejados por la 8-OGG1 catalizando la hidrólisis del enlace fosfodiéster directamente adyacente al sitio abásico para producir un corte de hebra única con extremos 5-fosfato y 3-hidroxilo.

- XRCC1 (X-ray repair cross complementing group 1)

Codificada en el cromosoma 19q13.2; enzima que juega un papel crítico en la ruta BER de reparación del DNA al atraer a distintas enzimas de dicha ruta a los sitios de daño en el DNA y promover la eficacia de la ruta(130), (131). En concreto, esta enzima contiene tres dominios de unión a tres enzimas: DNA polimerasa B, poli(ADP)ribosa polimerasa (PARP) y DNA ligasa III. Su expresión conservada en testículo y mayor que en otros tejidos parece indicar que durante la espermiogénesis se encargaría de reparar el daño en el DNA producido durante la meiosis.

2.6) Prostatomas e infertilidad

Las células liberan al medio extracelular distintos tipos de vesículas que participan en la comunicación intercelular. A estas vesículas se les conoce de manera colectiva como vesículas extracelulares (EVs) e incluyen cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas. La primera referencia que aparece en la bibliografía respecto a la existencia de las vesículas extracelulares la encontramos en la década de 1940 a 1950 cuando se descubrió que el suero libre de plaquetas contenía un factor coagulante que podía ser precipitado centrifugando a 31000g; veinte años después se demostró que ese factor era en realidad una serie de partículas de 20 a 50 nm de diámetro con contenido lipídico. Desde entonces se han encontrado vesículas extracelulares en todo tipo de fluidos biológicos incluyendo suero, saliva, orina, leche materna, semen, fluidos respiratorios... y han sido también aisladas desde medios de cultivo celular.

Sin embargo, a lo largo de todo este tiempo se ha mantenido cierta inexactitud respecto a cómo clasificar los distintos tipos de vesículas encontrados. Finalmente se ha llegado

a un consenso según el cual las vesículas extracelulares se clasifican en tres grupos en función de su tamaño y de su vía de liberación (132) (ver **Tabla 4**):

- Exosomas: de menos de 100 nm de diámetro se originan a partir de los cuerpos multivesiculares.
- Microvesículas: de 100 a 1000 nm de diámetro se originan por gemación directa de la membrana plasmática.
- Cuerpos apoptóticos: fragmentos celulares de 50 a 5000 nm de diámetro que se originan durante la muerte celular.

Característica	Exosomas	Microvesículas	Cuerpos apoptóticos
Tamaño	30-100 nm	100-1000 nm	50-5000 nm
Densidad	1.10-1.21 g/mL	No determinada	1.16-1.28 g/mL
Sedimentación	100000 – 200000 g	10000-20000 g	1200-10000 g
Composición lipídica	Regiones ricas en colesterol, esfingomielina y ceramida. Baja concentración de fosfatidilserina.	Colesterol. Alta concentración de fosfatidilserina.	Alta concentración de fosfatidilserina.
Marcadores proteicos	CD63, CD9, CD81, HSP70, Alix, Tsg101	Selectinas, integrinas, CD40	Histonas
Perfil de RNA	miRNAs, mRNAs, no rRNAs	Depende del tipo celular de origen	rRNAs
Origen intracelular	Cuerpos multivesiculares	Membrana plasmática	Membrana plasmática
Mecanismo de liberación	Exocitosis de cuerpos multivesiculares	Gemación de la membrana plasmática	Rotura celular y gemación desde la membrana durante la muerte celular.

Tabla 4: Principales características de las tres tipos de vesículas extracelulares.

La principal función que realizan las vesículas extracelulares es participar en la comunicación intercelular ya que actúan como vehículos que transportan proteínas, lípidos y RNAs de la célula emisora a células receptoras tanto a nivel local como a larga distancia.

2.6.a) Exosomas

Los exosomas son vesículas extracelulares de menos de 100 nm de diámetro con un origen endocítico.

La gemación de la membrana de los endosomas tempranos y tardíos hacia el interior de los mismos provoca la liberación de vesículas intraluminares. Estas vesículas

intraluminares contienen tanto proteínas transmembrana incorporadas durante la invaginación como material citosólico (ver **Figura 5**). La acumulación de las vesículas intraluminares en el interior de los endosomas tardíos provoca la formación de los llamados cuerpos multivesiculares. Los cuerpos multivesiculares, en función de sus características particulares, pueden fusionarse con los lisosomas y degradarse o pueden fusionarse con la membrana plasmática celular liberando las vesículas intraluminares al exterior. A partir de su liberación las vesículas intraluminares pasan a ser llamadas exosomas(133).

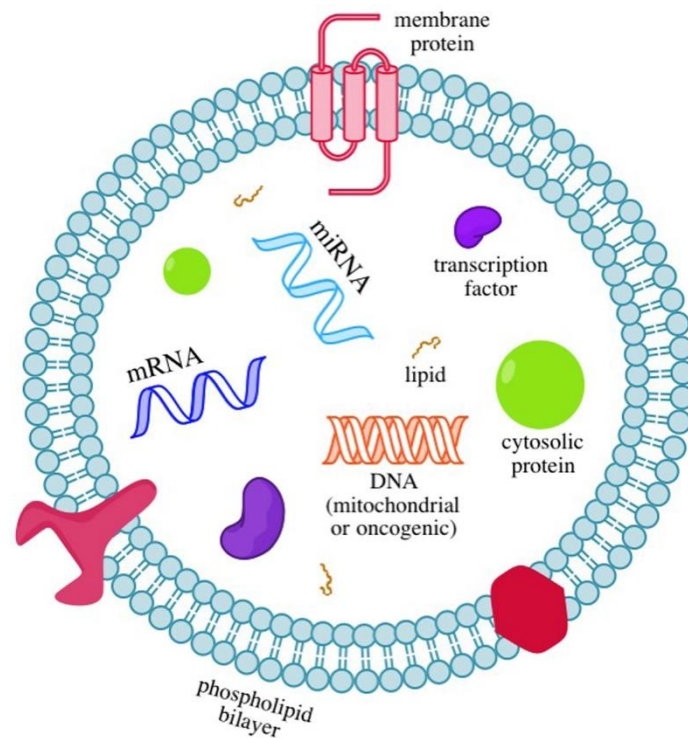


Figura 5: Estructura de un exosoma (<https://www.cancerquest.org>).

Una vez liberados al medio extracelular los exosomas son capaces de actuar sobre células receptoras y modular su actividad y esto lo pueden realizar por dos vías bien diferentes: por fusión con la célula receptora o por interacción con esta a través de proteínas de membrana. En principio la vía más común de actuación de los exosomas sobre las células receptoras es por fusión con éstas, transfiriéndoles así su contenido. Diversos estudios han demostrado que los exosomas son capaces de fusionarse con la célula receptora y transferirle su carga de RNAs y proteínas y que esta carga es funcional en dicha célula receptora pudiendo modificar la expresión génica de la misma. Por otra parte, también se ha sugerido recientemente que podrían actuar sobre las células receptoras a través de sus proteínas de membrana, tanto de modo justacrino como por fragmentación de sus proteínas de membrana por proteasas actuando los fragmentos resultantes como ligandos para los receptores de membrana de la célula diana. Se ha comprobado que los exosomas pueden tener efectos tanto inmunosupresores como inmunoestimuladores en las células receptoras (132).

2.6.b) Aislamiento y caracterización de los exosomas

Los exosomas pueden ser aislados tanto de los fluidos corporales como de los medios de cultivo celular mediante distintos métodos como son la ultracentrifugación diferencial, la captura con partículas por inmunofinidad y la exclusión por tamaño con cromatografía. De entre los métodos existentes para aislar exosomas el más comúnmente utilizado es la centrifugación diferencial (134). Este método consiste en realizar una serie de centrifugaciones cada vez a mayor velocidad para ir precipitando un tipo de vesícula extracelular en cada centrifugación en base a su coeficiente de sedimentación: cuanto mayor sea la vesícula mayor será su coeficiente de sedimentación y menor el tiempo y velocidad necesarios para precipitarla. Así, primeramente se centrifuga a unas 300g para precipitar las células, seguido de una centrifugación a unas 2000g para precipitar los cuerpos apoptóticos. A continuación, se realiza una centrifugación a velocidad media, unas 16000g, para precipitar las microvesículas y finalmente se realiza una ultracentrifugación a unas 100000g para precipitar los exosomas. Si se quiere purificar más los exosomas aislados se pueden resuspender en PBS y volver a precipitar o bien utilizar un gradiente de densidad.

Una vez aislados los exosomas la manera más adecuada de conservarlos es congelados a -80°C . De hecho, se ha observado que los exosomas sufren una reducción de tamaño después de ser mantenidos durante 48 horas a 37°C o durante 72 horas a 4°C .

Una vez aislados los exosomas se pueden caracterizar utilizando diversas técnicas:

- Microscopía electrónica: es la técnica más rápida que existe a día de hoy para valorar una muestra de exosomas porque nos permite visualizarlos directamente y observar su tamaño y morfología. En un principio, cuando se empezó a utilizar esta técnica se pensó que los exosomas tendrían forma de tazón pero recientemente se ha comprobado que esa morfología es un artefacto visual siendo realmente esféricos.
- Western blot: se puede valorar la composición de una muestra de exosomas utilizando la técnica de western blot. Así, por una parte, empleando anticuerpos genéricos de exosomas (por ejemplo CD63 y tetraspaninas) se puede comprobar la presencia de los mismos en la muestra mientras que empleando anticuerpos específicos del tipo de exosoma se puede determinar el origen celular de los exosomas.
- Citometría de flujo.
- Aislamiento y análisis de perfil de RNA: permite determinar la presencia de exosomas en base a su perfil característico de RNA con una gran cantidad de microRNA y ausencia total de RNA ribosomal.
- Aislamiento y análisis del contenido proteico mediante espectrometría de masas.
- Otras técnicas más complejas como el análisis de nanopartículas (NTA) o el Scanning Ion Occlusion Sensing (SIOS).

2.6.c) Vesículas extracelulares en el plasma seminal

El plasma seminal está compuesto por cuatro tipos de secreciones: secreciones del epidídimo, secreciones de las vesículas seminales (50-80%), secreciones de la próstata (20-30%) y secreciones de las glándulas de Cowper (2-5%). De entre ellas son las secreciones del epidídimo y las secreciones de la próstata las que aportan al plasma seminal vesículas extracelulares de interés (135).

A) Epididimosomas

Los epididimosomas son microvesículas presentes en el plasma seminal con un tamaño comprendido entre 0.1 a 1 μm de diámetro que proceden de la gemación de las células de la pared del epidídimo (136). Su composición varía dependiendo de la región del epidídimo de la que provengan, aunque de manera general incluyen proteínas de membrana relacionadas con la unión del espermatozoide al óvulo y proteínas citoplásmicas de la ruta de la fructosa que se relacionarían con la movilidad espermática (137).

Se considera que los epididimosomas son imprescindibles para la maduración del espermatozoide y esto queda demostrado porque son capturados de manera muy eficiente por los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo, apareciendo en muy baja concentración en el plasma seminal del eyaculado.

B) Prostasomas

Los prostasomas son exosomas cuyo tamaño está comprendido entre 30 y 130 nm de diámetro y que son generados en el epitelio prostático a partir de cuerpos multivesiculares. Aparecen en gran concentración en el plasma seminal del eyaculado.

Su composición general es similar a la del resto de los exosomas teniendo como marcadores específicos (138), (139), (140):

- Fosfatasa ácida prostática (PAP)
- Antígeno específico prostático (PSA)
- Proteasa serina transmembrana tipo 2 (TMPRSS2)
- Transglutaminasa específica prostática (TGASE-P)
- Antígeno de célula madre prostática (PSCA)

Se ha comprobado que los prostasomas se fusionan con los espermatozoides después de la eyaculación una vez se encuentran ambos en el ambiente ácido del tracto reproductivo femenino aunque no existe consenso respecto al momento exacto en que se produce dicha fusión. Unos estudios sostienen que la fusión se produce ya en la vagina mientras que otros abogan porque en realidad los prostasomas entre la vagina y el útero únicamente se pegan a la superficie de los espermatozoides, para acompañarlos durante su tránsito por la trompa de Falopio y finalmente fusionarse con estos cuando alcanzan el entorno del cúmulo (141). En cualquier caso, si parece existir acuerdo respecto a que

los prostasomas precisan de la existencia de un pH ácido para poder fusionarse con los espermatozoides.

Los prostasomas tienen múltiples funciones en el proceso de la reproducción (142), (143):

- Contribución en la licuefacción: por contener la enzima PSA y el factor tisular CD142 contribuyen a la licuefacción del plasma seminal.
- Fomento de la motilidad espermática: la fusión de los prostasomas con los espermatozoides propicia el aumento de la concentración de calcio dentro del espermatozoide necesario para aumentar la motilidad. Parece que los prostasomas actúan tanto transfiriendo directamente calcio al espermatozoide como incorporando anexinas a la membrana del espermatozoide que se encarguen del transporte del mismo desde el plasma seminal. Varios estudios han demostrado que tratar muestras seminales con aislados de prostasomas provoca un aumento de la motilidad (144), (145), (146), (147).
- Participación en la capacitación y la reacción acrosomal: por una parte, al transferir colesterol y esfingomielina a la membrana plasmática del espermatozoide reducen la fluidez de la misma retrasando así la reacción acrosomal hasta el momento adecuado. Por otra parte también se ha visto que transfieren al espermatozoide determinadas enzimas hidrolíticas como la ecto-diadenosina fosfato hidrolasa que son imprescindibles para que tenga lugar la reacción acrosomal al hacer al espermatozoide sensible a la progesterona liberada por las células del cúmulo (148).
- Protección inmunológica: participan en la respuesta inmunosupresora generada por el plasma seminal en el ambiente vaginal evitando así que los espermatozoides sean eliminados por el sistema inmune femenino. Por una parte, se ha comprobado que los prostasomas son capaces de inhibir la proliferación de los linfocitos. Así mismo, se ha demostrado que los prostasomas también tiene un efecto protector directo sobre los espermatozoides al transferirles moléculas de membrana como la membrane attack complex (MAC) inhibitory protein CD59.
- Fomento de la coagulación: debido a que contienen el factor tisular CD142 en su membrana fomentan el rápido cierre de abrasiones y sangrados que puedan ocurrir durante el acto sexual. Este efecto tiene una doble utilidad ya que por una parte evita el acceso de componentes del espermatozoide al tracto sanguíneo femenino reduciendo el riesgo de formación de anticuerpos antiespermatozoide y por otra parte también reduce el riesgo de transmisión de enfermedades como el VIH.

- Capacidad antioxidante: al tener propiedades inmunosupresoras inhiben la actividad de los leucocitos, probablemente provocando un aumento de la rigidez de la membrana de estos al fusionarse con ellos, reduciendo así la producción de radicales superóxido por los mismos (149).
- Capacidad antibacteriana: los prostasomas contienen la proteína catiónica antimicrobiana 18 (hCAP-18) y la proteína chromogranin B, proteínas que se unen a la membrana bacteriana y provocan la deformación de la misma y la aparición de poros lo cual deriva en la muerte de la bacteria (150).

3) Búsqueda de biomarcadores de infertilidad masculina

Un biomarcador es un indicador biológico de un proceso, evento o condición que puede ser medido, evaluado y comparado de una manera objetiva (151). De entre las posibles aplicaciones que tienen los biomarcadores es seguramente la detección de enfermedades aquella que más interés ha suscitado entre la comunidad científica. Un buen biomarcador de una enfermedad deberá cumplir con ciertos requisitos:

- Identificar la enfermedad en fases tempranas.
- Ser fácilmente detectable mediante sistemas no invasivos.
- Ser coste-efectivo.
- Ser preciso.

El desarrollo de biomarcadores que cumplan con los citados requisitos resulta de gran importancia para la práctica clínica ya que permite reducir o eliminar el uso de otros métodos de detección de enfermedades más antiguos que precisan de procedimientos invasivos. Es por ello que, con objeto de cumplir el requisito dos, la búsqueda de biomarcadores se realiza fundamentalmente empleando muestras de fluidos que se puedan obtener fácilmente de un modo no invasivo o mínimamente invasivo: sangre, orina, semen, saliva... A estos métodos se les conoce como biopsia líquida en contraposición con los métodos previamente existentes de análisis de muestras de tejido llamados biopsia sólida.

En el contexto de la fertilidad/infertilidad masculina un buen biomarcador deberá permitir, de un modo preciso y no invasivo, evaluar el potencial de un varón para tener descendencia y determinar la causa de una posible reducción de dicho potencial. De este modo, un buen biomarcador de infertilidad masculina debería actuar como un complemento del seminograma clásico para permitir seleccionar el tratamiento más adecuado para cada paciente o para permitir una evaluación aún más precisa de los candidatos a donantes de semen.

Como ya se ha mencionado, hace ya cierto tiempo que la comunidad científica se ha dado cuenta de que el empleo del seminograma clásico de manera exclusiva resulta incompleto a la hora de valorar la situación de infertilidad masculina. Este sistema no

solo no permite en muchos casos determinar la existencia de un problema de fertilidad (situación conocida como infertilidad idiopática) sino que incluso cuando sí que se ofrece un diagnóstico de infertilidad generalmente no permite determinar la causa subyacente que está provocando esa situación. Ante esto se hace necesario buscar nuevos biomarcadores que complementen al seminograma clásico.

La búsqueda de biomarcadores de infertilidad masculina presenta una clara ventaja respecto a la búsqueda de biomarcadores para muchas otras enfermedades y es que uno de los requisitos se puede cumplir con relativa facilidad: ser detectable mediante sistemas no invasivos. Resulta evidente que el eyaculado es una fuente excelente de biomarcadores de infertilidad masculina ya que por un lado se obtiene por métodos no invasivos y por otro cuenta con los implicados directos en la reproducción por parte del varón: los espermatozoides. De este modo el semen puede ofrecer biomarcadores de infertilidad masculina presentes en los propios espermatozoides, pero también biomarcadores presentes en el plasma seminal, tanto libres como incluidos en vesículas extracelulares (fundamentalmente prostasomas).

Uno de los primeros biomarcadores de infertilidad masculina que se estudió es la presencia de anticuerpos antiespermatozoide en el plasma seminal, anticuerpos que aparecen cuando se rompe la barrera sangre-testículo y afectan a la fertilidad provocando la aglutinación de los espermatozoides entre otros mecanismos (152). La reacción acrosomal también ha sido ampliamente estudiada como fuente de biomarcadores de infertilidad masculina habiendo llegado a desarrollarse el llamado test de penetración espermática que permite evaluar de manera conjunta la reacción acrosomal, la capacitación espermática y la capacidad del espermatozoide para penetrar en el óvulo y descondensar su material genético (153). Sin embargo, ha sido en los últimos años cuando la búsqueda de biomarcadores de infertilidad masculina más ha avanzado gracias al desarrollo de los sistemas de análisis masivo. Varios son los enfoques en los que se está trabajando: genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica.

3.1) Enfoque genómico

Se estima que en un 15-30% de los casos de infertilidad masculina existe alguna causa genética subyacente (154). El estudio de las bases genéticas de la infertilidad comenzó en la década de los años 50 del siglo pasado cuando se empezó a utilizar el análisis del cariotipo para identificar anomalías cromosómicas causantes de infertilidad (se considera que la incidencia de anomalías cromosómicas es 5 veces superior en varones infértiles que en la población normal) (155). Desde entonces se ha trabajado en la búsqueda de genes o regiones génicas relacionados con el desarrollo de infertilidad masculina que puedan ser empleados como biomarcadores siendo las microdelecciones en el cromosoma Y (AZFa, AZFb y AZFc) (156) y las mutaciones en el gen codificante para el regulador transmembrana de la fibrosis quística (157) los que más relevancia han alcanzado. Recientemente, el desarrollo de nuevas tecnologías ha hecho que se evalúen

otros aspectos genéticos como fuente de biomarcadores de infertilidad incluyendo las variaciones en número de copias génicas, las variaciones en los niveles de expresión génica, la presencia de mutaciones puntuales en determinados genes (SNPs) o incluso el estudio de variaciones a nivel epigenético. Por otra parte, con el descubrimiento reciente de la existencia de un número limitado de RNAs en el espermatozoide, tanto codificantes como no codificantes, también se ha planteado el empleo de estos como biomarcadores.

3.2) Enfoque proteómico

Los estudios proteómicos buscan analizar el conjunto de proteínas expresadas en un tipo celular. Con la metodología de la que se dispone actualmente un estudio proteómico puede tanto detectar la presencia de determinadas proteínas como evaluar su cantidad y sus modificaciones postraduccionales (158). La búsqueda de biomarcadores proteicos de infertilidad en el eyaculado comenzó en la década de los años 40 y se ha llevado a cabo tanto en el plasma celular como en los propios espermatozoides, si bien la búsqueda de biomarcadores en estos últimos se ha realizado mayoritariamente con el objetivo de localizar dianas para el desarrollo de fármacos anticonceptivos (159). Por el contrario, en el plasma seminal sí que han sido ya propuestos algunos biomarcadores proteicos de infertilidad como por ejemplo la transferrina, las proteínas de unión a heparina (HBPs), la proteína inducible por prolactina (PIP)...(160)

3.3) Enfoque metabolómico

Si en el enfoque proteómico se estudia el conjunto de proteínas expresadas en un tipo celular, en el metabolómico se estudia el conjunto de las pequeñas moléculas producto del metabolismo celular (metabolitos) (161). Muchos científicos piensan que este enfoque podría ser el más acertado ya que reflejaría lo que realmente ocurre a nivel celular de un modo más exacto que la genómica y la proteómica. Por el momento, la búsqueda de biomarcadores de infertilidad masculina a nivel metabolómico está en sus inicios y se ha centrado fundamentalmente en los metabolitos producto del estrés oxidativo (162).

3.4) Breve descripción de los enfoques empleados en esta tesis doctoral

En la presente tesis doctoral se ha intentado identificar nuevos biomarcadores de infertilidad masculina. Para ello se ha trabajado sobre la idea de la biopsia líquida y se ha empleado como fuente de marcadores la muestra seminal, fluido que se obtiene por métodos no invasivos y que cuenta con los implicados directos en la reproducción por parte del varón: los espermatozoides. Concretamente se ha trabajado con las dos fracciones del eyaculado por separado y aplicando un enfoque distinto en cada caso.

En una primera aproximación más tradicional se han empleado los espermatozoides presentes en el eyaculado y se ha aplicado un enfoque genético para determinar la relación existente entre la infertilidad masculina y la presencia de una serie de mutaciones puntuales localizadas en genes codificantes para enzimas antioxidantes o de

reparación del daño en el DNA. En concreto, se han empleado: i) una técnica de análisis genético clásica, el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para determinar la presencia de una serie específica de SNPs previamente seleccionados en base a su relevancia en la bibliografía (ver **Tabla 5**) y ii) la técnica de PCR multiplex para determinar la presencia de dos variantes nulas de las enzimas antioxidantes GSTT y GSTM. Este enfoque ofrece la fortaleza de que los marcadores genéticos tipo polimorfismo son fijos para cada individuo a lo largo de su vida.

SNP	DNA		Proteína	
	Base	Cambio	Aminoácido	Cambio
SOD2 Ile54Thr		ATA → ACA	54	Ile → Thr
SOD2 rs4880	2246	GCT → GTT	16	Ala → Val
CAT rs1001179	-262	C → T		
GPX rs1050450	679	CCC → CTC	200	Pro → Leu
OGG1 rs1052133	1245	UCC → UGC	326	Ser → Cys
XRCC1 rs25487	28152	CGA → CAA	399	Arg → Gln

Tabla 5: Selección de polimorfismos analizados en la presente tesis doctoral.

En la segunda aproximación se ha realizado un planteamiento mucho más masivo. Empleando los prostasomas presentes en el plasma seminal como fuente de biomarcadores se ha utilizado un enfoque proteómico realizando una búsqueda de marcadores proteicos a gran escala mediante espectrometría de masas. Por otra parte, también se ha realizado un estudio preliminar de la carga de DNA de los prostasomas. Este tipo de marcadores presenta dos fortalezas: por una parte, cada vez más estudios apuntan a que la carga de los exosomas se determina mediante procesos de selección de carga perfectamente organizados y es por tanto un marcador considerablemente estable, sin duda al menos más estable que parámetros como la motilidad o la morfología que varían con un simple cambio en la temperatura escrotal. Por otra parte, la carga de los exosomas está protegida frente al ataque de agentes externos por lo que resulta un marcador de mejor calidad que las moléculas que aparecen libres en los biofluidos, en nuestro caso que las moléculas libres en el plasma seminal.

OBJETIVOS

La capacidad fertilizante de un eyaculado tiene una gran importancia para llevar a cabo con éxito técnicas de reproducción asistida. El semen es un fluido complejo compuesto por células (esencialmente espermatozoides) y plasma seminal que podría usarse como muestra clínica para la búsqueda de biomarcadores, a modo de biopsia líquida del tracto reproductor masculino.

La valoración de la calidad seminal continúa llevándose a cabo mediante el análisis de características físicoquímicas del plasma seminal y el uso de criterios subjetivos para clasificar la motilidad y morfología de los espermatozoides. Estas medidas tienen muchas limitaciones para predecir la fertilidad, ya que un 15 % de varones infértiles presentan un seminograma normozoospermico. Por ello en los últimos años se ha propuesto que sería más adecuado y fiable utilizar marcadores moleculares específicos y seleccionables. Ante esto en la presente tesis se pretende desarrollar nuevos biomarcadores, a partir del DNA espermático y de los prostasomas del plasma seminal, que en un futuro puedan complementar al seminograma y faciliten el aumento de las tasas de éxito en la aplicación de las técnicas de reproducción asistida.

Para ello se han planteado los siguientes objetivos según partamos de plasma seminal o de los espermatozoides.

Objetivo 1. Estudiar la capacidad predictiva de fertilidad de polimorfismos presentes en genes codificantes para enzimas que forman parte de los sistemas seminales de defensa frente al estrés oxidativo y de reparación del DNA.

1.1. Generar un banco de DNAs espermáticos procedentes de individuos fértiles y de pacientes infértiles.

1.2. Caracterizar polimorfismos tipo SNP localizados en genes codificantes para enzimas de reparación del daño en el DNA espermático y para enzimas de los sistemas de defensa frente al estrés oxidativo, en una población de individuos donantes con fertilidad probada e individuos con problemas de fertilidad.

1.3. Estudiar la asociación de estos polimorfismos con el seminograma (volumen, concentración, motilidad y morfología), la fragmentación del DNA y el estrés oxidativo.

1.4. Caracterizar funcionalmente aquellos polimorfismos que presenten diferencias entre donantes y pacientes.

Objetivo 2. Estudiar la carga de prostasomas presente en el plasma seminal de individuos normozoospermicos y no normozoospermicos ya que pueden contener perfiles de proteínas, DNA y RNAs específicos de situaciones fisiológicas y patológicas.

2.1. Aislar y caracterizar los prostasomas presentes en plasma seminal de individuos control normozoospermicos y en pacientes con el seminograma alterado.

2.2. Analizar mediante un enfoque proteómico el contenido en proteínas presente en los prostasomas aislados de los dos tipos de muestras.

2.3. Descubrir nuevos biomarcadores proteicos expresados diferencialmente entre prostasomas aislados de eyaculados normozoospermicos y no normozoospermicos. Validar los biomarcadores más significativos mediante western blot.

2.4. Realizar un análisis preliminar de la carga de DNA presente en los prostasomas.

Objetivo 3: Determinar cuáles de los parámetros estudiados podrían ser de utilidad para implantarlos en un futuro en el ámbito clínico como biomarcadores de infertilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio ha sido aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Madrid (CEI 60-1058) (ver **anexo III**)

1) Muestras

Para la realización de la presente tesis se trabajó con un total de 543 muestras de semen humano las cuales fueron amablemente facilitadas por la clínica de reproducción asistida GINEFIV (Madrid, España) cumpliendo todos los requerimientos éticos y legales pertinentes.

En la primera parte de la tesis, la centrada en la búsqueda de marcadores a nivel genético, se incluyeron 493 muestras de semen clasificadas en dos subgrupos o cohortes:

- Población infértil (413): muestras de semen de pacientes infértiles que se estaban sometiendo a algún tipo de tratamiento FIV/ICSI. Únicamente se incluyeron en el estudio pacientes que no mostrasen la presencia de ninguna enfermedad con efecto conocido sobre la fertilidad (cáncer de próstata, criptorquidismo, varicocele, diabetes, infección seminal, alteración en el cariotipo...). Cada varón participante en el estudio donó 1ml de semen obtenido por masturbación en un bote estéril tras una media de 4 días de abstinencia (periodo de abstinencia empleado de manera rutinaria en la clínica colaboradora). De estas muestras, 313 se emplearon en el estudio genotípico inicial y las restantes 100 en los experimentos de validación de resultados.
- Población fértil (80): muestras de semen de donantes con fertilidad probada (donantes con muestra utilizada con anterioridad en tratamiento de reproducción asistida habiendo obtenido embarazo). Provenientes de banco de semen.

En la segunda parte de la tesis, la centrada en la búsqueda de marcadores a nivel prostasómico, se emplearon 50 muestras de semen siendo 25 normozoospermicas y 25 no normozoospermicas de acuerdo con los criterios de la OMS 2010.

2) Seminograma tradicional

Todos los eyaculados incluidos en el estudio fueron caracterizados mediante un seminograma tradicional realizado unos 30 minutos post eyaculación siguiendo las recomendaciones contenidas en el manual OMS 2010. En dicho seminograma se incluyeron los siguientes parámetros volumen (mL), concentración (millones/mL), motilidad (%) y morfología (%).

3) Fragmentación del DNA espermático

Para todas las muestras incluidas en la cohorte de población infértil se determinaron los niveles de fragmentación del DNA espermático mediante el método SCD (Sperm Chromatin Dispersion Assay) para lo cual se utilizó el kit comercial Halosperm (Halosperm Kit, Halotech DNA, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del

fabricante. De cada muestra se diluyó una alícuota hasta alcanzar concentraciones espermáticas de 10-15 millones/mL. 20 µL de cada alícuota se mezclaron con 50 µL de agarosa fundida. 10 µL de la mezcla resultante se pipetearon en un portaobjetos pretratado y se cubrieron con un cubreobjetos. Manteniendo el portaobjetos en horizontal sobre una placa metálica, se dejó durante 5 min que la agarosa solidificara a 4°C para obtener un microgel. Se retiró suavemente el cubreobjetos e inmediatamente después se sumergió el portaobjetos en la solución de desnaturalización, donde se mantuvo durante 7 min a temperatura ambiente. Seguidamente se sumergió el portaobjetos durante 25 min en solución de lisis. Finalmente se lavó el portaobjetos sumergiéndolo en agua destilada durante 5 min y se deshidrató con una serie de inmersiones de 2 min en alcoholes de concentración creciente (70%-90%-100%). Después de secar todos los portaobjetos a temperatura ambiente durante 24 horas se procedió a analizar las muestras mediante microscopía de fluorescencia. Para ello se tiñó cada muestra con 3 µL de una mezcla 1:1 del fluorocromo específico para tinción de DNA SYBR-Green (SYBR-Green 10000X, n° catalogo S7563, Thermo Fisher Scientific, Brawnschweig, Alemania) en medio de montaje para fluorescencia (Vectashield Mounting Medium, n° catalogo H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, USA). La visualización de las muestras se realizó a 60X mediante microscopia de epifluorescencia utilizando un microscopio Leica DMRB (Leica-Mycrosystems, Wetzlar, Germany). Se analizaron un mínimo de 300 espermatozoides en cada muestra. La categorización de los distintos tamaños de halo observados con el test SCD se realizó en base a los cinco grupos SCD establecidos por Fernández *et al.*, 2003 (163).

4) Estrés oxidativo

El nivel de estrés oxidativo de cada muestra se determinó utilizando el kit comercial OxiSperm (OxiSperm Kit, Cat No HT-OS, Halotech DNA, Madrid, Spain). Este kit, basado en el ensayo del azul de tetrazolio, consiste en un gel reactivo (RG) que contiene una sal de tetrazolio hidrosoluble. El gel RG se fundió en un baño de agua a 90°C, se dejó atemperar a 37°C y se mezcló con la muestra seminal en proporción 1:1. La mezcla resultante se incubó a 37°C durante 45 min. Durante la incubación la sal de tetrazolio hidrosoluble reacciona con los aniones superóxido (O_2^-) de la muestra seminal produciendo un cristal insoluble azul llamado formazan. El color resultante en la muestra se comparó con la clave de colores proporcionada con el kit y se determinaron los correspondientes niveles de estrés oxidativo (ver **Figura 6**). Para realizar los correspondientes análisis estadísticos las muestras analizadas fueron clasificadas en 2 grupos: muestras con bajo estrés oxidativo (N1-N2) y muestras con alto estrés oxidativo (N3-N4).

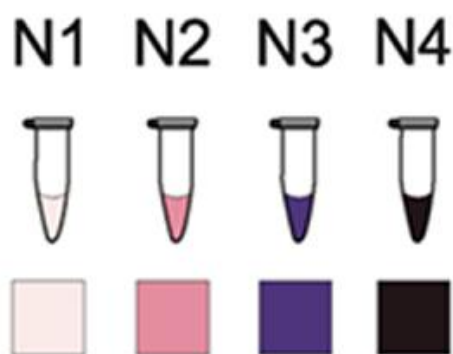


Figura 6: Clave de colores proporcionada por el kit OxySperm para la determinación de los niveles de estrés oxidativo en muestras seminales.

5) Análisis genotípico

Para determinar el genotipo de las muestras para cada polimorfismo se realizó una extracción del correspondiente DNA espermático mediante el método fenol-cloroformo seguida de un genotipado mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) o PCR multiplex dependiendo de la variante a analizar. Además, para cada polimorfismo estudiado se seleccionaron 3 muestras por variante que se enviaron a una unidad externa para su secuenciación; las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa informático BioEdit v7.0.5 (Ivis therapeutics, Carlsbad, USA) para confirmar los genotipos obtenidos mediante RFLP y PCR multiplex.

5.1) Extracción del DNA espermático mediante el método fenol-cloroformo

La extracción del DNA espermático se realizó mediante el método fenol-cloroformo con tratamiento con proteinasa K. Se centrifugaron 500 μ L de semen a 1800 rpm durante 10 min y el pellet obtenido se resuspendió en 100 μ L del propio plasma de la muestra. Seguidamente se incubó cada muestra overnight a 56°C en agitación en una solución consistente en 8 μ L 10 mg/mL de proteinasa K (Proteinase K Recombinant PCR Grade, Cat No 03 115 887 001, Roche, Mannheim, Alemania), 8 μ L de 1M DTT y 100 μ L de tampón de extracción (20 mM Tris-Cl, 20 mM EDTA, 200 mM NaCl, 4% SDS). A continuación, se añadió a cada muestra 216 μ L de fenol (Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol 25:24:1, Cat No 327115000, Acros Organics, New Jersey, USA) y se agitó durante 2 min tras lo cual se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min. Entonces se recuperó la fase acuosa superior y se repitió la misma operación con 200 μ L de cloroformo:isoamil 24:1 (Chloroform reagent grade, Cat No CL02031000, Scharlab, España e Isoamylalkohol >98%, Cat No 818969, Merck, Munich, Alemania). Nuevamente se recuperó la fase acuosa superior y se le añadió a la misma 250 μ L de etanol 100% frío (-20°C). Esta solución se agitó vigorosamente hasta lograr la precipitación del DNA tras lo cual se dejó reposar overnight a -20°C. El DNA obtenido fue entonces lavado con etanol 70% frío (-20°C) y secado al aire a temperatura ambiente. Para eliminar posible RNA contaminante se resuspendió el pellet de DNA en 50 μ L de tampón TRIS-EDTA con 0.5 μ L de RNasa 1 mg/mL (Rnase Dnase free, Cat

No 11 119 915 001, Roche, Mannheim, Alemania) y se incubó 2 h a 37°C. Finalmente se determinó la concentración del DNA extraído mediante el sistema NanoDrop (NanoDrop-1000, Thermo Scientific, Brawnschweig, Alemania) y se prepararon diluciones de uso a una concentración de 50 ng/μL las cuales se conservaron a 4°C.

5.2) Genotipado

Mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

El genotipo de los polimorfismos OGG1 Ser326Cys (rs1052133), XRCC1 Arg399Gln (rs25487), SOD2 Ile58Thr, SOD2 Val16Ala (rs4880), CAT C-262T (rs1001179) y GPX1 Pro200Leu (rs1050450) se determinó mediante la técnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). La **Tabla 6** muestra la información correspondiente a la amplificación de los genes mediante PCR (secuencias de los primers, temperaturas de anillamiento y tamaño de los productos de PCR) y la **Tabla 7** las condiciones de cada PCR. La **Tabla 8** muestra la información correspondiente a la digestión de los productos de PCR mediante enzimas de restricción. Todos los reactivos empleados en las PCRs fueron de la casa Bioline (Bioline Reagents, Reino Unido) mientras que las enzimas de restricción utilizadas fueron las Fast Digest de Thermo Fisher Scientific (FastDigest Restriction Enzymes, Cat Nos SmaI-FD1644, MspI-FD0544, EcoRV-FD0303, HaeII-FD0154, SmaI-FD0664, Thermo Scientific, Brawnschweig, Alemania).

Gen	SNP	Primer PCR	TM	Producto PCR
HOGG1	Ser326Cys	F 5'-GGAAGGTGCTTGGGGAAT-3' R 5'-ACTGTCACTAGTCTCACCAG-3'	56°C	200 pb
XRCC1	Arg399Gln	F 5'-TTGTGCTTTTCTCTGTGTCCA-3' R 5'-TCCTCCAGCCTTTTCTGATA-3'	56°C	615 pb
SOD2	Ile58Thr	F 5'-AGCTGGTCCCATTATCTAATAG-3' R 5'-TCAGTGCAGGCTGAAGAGAT-3'	56°C	140 pb
SOD2	Ala-9Val	F 5'-GCCCAGCCTGCGTAGACGGTCCC-3' R 5'-TGCCTGGAGCCAGATACCCCAAG-3'	59°C	110 pb
CAT	-262 C→T	F 5'-ATTCCGTCTGCAAACTGGC-3' R 5'-GAGCCTCGCCCCGCCGGCCCG-3'	59°C	129 pb
GPX1	Pro200Leu	F 5'-TGTGCCCCCTACGCAGGTACA-3' R 5'-CCAAATGACAATGACACAGG-3'	57°C	338 pb

Tabla 6: Análisis de SNPs mediante RFLP. Parte correspondiente a la amplificación de los genes por PCR.

Reactivos	Ciclos
DNA 1.5 μL 50 ng/μL	Desnaturalización inicial 94°C 5 min
Tampón 2.5 μL 10X	35 ciclos:
MgCl ₂ 1 μL 50 mM	Desnaturalización 94°C 30 seg
dNTPs 0.5 μL 10 mM	Anillamiento T ^a 30 seg
Taq polimerasa 0.25 μL 5 U/μL	Extensión 72°C 30 seg
Primer F 0.2 μL 20 μM	Extensión final 72°C 10 min
Primer R 0.2 μL 20 μM	
H ₂ O 18.85 μL	

Tabla 7: Análisis de SNPs mediante RFLP. Condiciones de las PCR.

Gen	SNP	Enzima rest.	Electroforesis		Bandas digestión
HOOG1	Ser326Cys	SatI	Agarosa 3% en 1X	D1 TAE	Ser/Ser 200 Ser/Cys 200/100 Cys/Cys 100
XRCC1	Arg399Gln	MspI	Agarosa 3% en 1X	D1 TAE	Arg/Arg 374,221 Arg/Gln 615,374,221 Gln/Gln 615
SOD2	Ile58Thr	EcoRV	Agarosa 4% en TBE 1X	MS8 1X	Thr/Thr 117 Ile/Thr 140,117 Ile/Ile 140
SOD2	Ala-9Val	HaeIII	Agarosa 4% en TBE 1X	MS8 1X	Ala/Ala 23,85 Ala/Val 23,85,110 Val/Val 110
CAT	-262 C→T	SmaI	Agarosa 4% en TBE 1X	MS8 1X	CC 99 CT 109,99 TT 109
GPX1	Pro200Leu	HaeIII	Agarosa 3% en 1X	D1 TAE	Pro/Pro 251,81 Pro/Leu 338,251,81 Leu/Leu 338

Tabla 8: Análisis de SNPs mediante RFLP. Parte correspondiente a la digestión mediante enzimas de restricción.

Mediante PCR multiplex

Las dos variantes nulas de las enzimas GSTM y GSTT se analizaron mediante PCR multiplex empleando el gen de la albumina como control interno. La **Tabla 9** muestra los tamaños de banda obtenidos mientras que la **Tabla 10** muestra las condiciones de la PCR.

Gen	SNP	Primer PCR	Producto PCR
GST	GSTM1	F 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' R 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTTT-3'	210 pb
GST	GSTT1	F 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' R 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	480 pb
Albumina		F 5'-GCCCTCTGCTAACAAGTCCTAC-3' R 5'-GCCCTAAAAAGAAAATCGCCAATC-3'	350 pb

Tabla 9: Tamaños de banda obtenidos al analizar las variantes nulas GSTT y GSTM mediante PCR multiplex. El gen de la albumina se empleó como control interno de la PCR.

Reactivos	Ciclos												
DNA 1.5 μ L 50 ng/ μ L	Desnaturalización inicial 94°C 5 min												
Tampón 2.5 μ L 10X	35 ciclos:												
ClMg 1 μ L 50 mM	Desnaturalización 94°C 30 seg												
dNTPs 0.5 μ L 10 mM	Anillamiento 62°C 30 seg												
Taq polimerasa 0.15 μ L 5 U/ μ L	Extensión 72°C 30 seg												
H ₂ O 18.05 μ L	Extensión final 72°C 10 min												
Primers 20 μ M													
<table><tr><th>Gen</th><th>Primer F</th><th>Primer R</th></tr><tr><td>GSTM1</td><td>0.5 μL</td><td>0.5 μL</td></tr><tr><td>GSTT1</td><td>0.25 μL</td><td>0.25 μL</td></tr><tr><td>Albumina</td><td>0.15 μL</td><td>0.15 μL</td></tr></table>	Gen	Primer F	Primer R	GSTM1	0.5 μ L	0.5 μ L	GSTT1	0.25 μ L	0.25 μ L	Albumina	0.15 μ L	0.15 μ L	
Gen	Primer F	Primer R											
GSTM1	0.5 μ L	0.5 μ L											
GSTT1	0.25 μ L	0.25 μ L											
Albumina	0.15 μ L	0.15 μ L											

Tabla 10: Condiciones de la PCR multiplex para analizar las variantes nulas GSTT y GSTM.

6) Análisis de actividad de la enzima catalasa en el plasma seminal

Para comprobar a nivel experimental las predicciones de expresión y actividad catalasa derivadas del análisis genotípico se realizó un estudio específico de la actividad catalasa en plasma seminal en una subpoblación seleccionada al azar de 36 muestras del grupo de muestras para validación de la población infértil incluyendo el mismo número de muestras para cada genotipo. Para todas ellas se analizó tanto la cantidad de proteína catalasa presente en el plasma seminal (western blot) como la actividad de dicha proteína (geles de actividad). En ambos procedimientos se empleó un enfoque basado en la metodología habitual de análisis seminal empleada en clínica, comparando según genotipos la actividad y la cantidad de la enzima catalasa en volúmenes similares de plasma seminal en lugar de en cantidad total de proteína, ya que este sería el enfoque empleado en caso de querer aplicar este biomarcador en clínica en un futuro. Este estudio se completó con una predicción *in silico* de la unión de factores de transcripción a dicho polimorfismo, empleando para ello el programa TFBind (<http://tfbind.hgc.jp/>).

6.1) Análisis de expresión de catalasa mediante western blot

Para valorar la cantidad de enzima catalasa presente en el plasma seminal se empleó la técnica de western blot. Para ello se realizaron geles de acrilamida desnaturizantes de 0.75 mm al 10% (ver **Tabla 11**).

	Gel separador Vol 2 geles 0.75 mm (10 mL)	Gel concentrador Vol 2 geles 0.75 mm (4 mL)
H ₂ O	3.6 mL	2.2 mL
Tris HCL 1 M pH 8.8	3 mL	1.2 mL
Acril/Bis 30% 19:1	3.3 mL	600 μ L
TEMED	10 μ L	4 μ L
APS 10% 0.1 mg/mL	100 μ L	40 μ L
SDS 10%	100 μ L	40 μ L

Tabla 11: Composición de los geles de acrilamida empleados en los western blot.

Para cada muestra se tomó una pequeña alícuota y se centrifugó a 2000 rpm 4 min para separar el plasma de los espermatozoides. Posteriormente se tomaron 7.5 µL de plasma seminal y se mezclaron con 7.5 µL de 2X tampón de carga Laemmli (2X Laemmli Sample Buffer, Cat No 1610737, BioRad Laboratories, California, USA). Los 15 µL resultantes se incubaron durante 5 min a 90°C para desnaturalizar las proteínas y se cargaron en el gel, el cual se corrió durante 3 horas a 120V. Para poder valorar el tamaño de las bandas obtenidas se cargó en un carril de cada gel 7 µL de marcador de tamaños (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Cat No 1610374, BioRad Laboratories, California, USA).

Una vez corrido el gel las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond-P PVDF membrane, Cat No RPN303F, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK), durando la transferencia 2 horas a 80 V. Finalizada la transferencia se marcó la proteína de interés mediante un procedimiento básico de marcaje con anticuerpos:

- Bloquear la membrana 1 hora con PBS + Tween 20 0.5% + leche en polvo desnatada al 5%.
- Incubar over night a 4°C con anticuerpo primario (catalase H-300, Cat No sc-50508, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) en PBS + Tween 20 0.5% + leche en polvo desnatada al 5%. Dilución 1:200.
- 3 lavados de 10 min cada uno con PBS + Tween 20 0.1%.
- Incubar 2 horas a temperatura ambiente (RT) con anticuerpo secundario (goat anti-rabbit IgG-HRP, Cat No sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) en PBS + Tween 20 0.1% + leche en polvo desnatada al 5%. Dilución 1:5000.
- 3 lavados de 10 min cada uno con PBS + Tween 20 0.1%.

Finalmente se reveló la membrana mediante quimioluminiscencia (Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent, Cat No RPN2235, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) y se fotografió con el dispositivo BIORAD ChemiDoc Molecular Imager XRS+ (BioRad Laboratories, California, USA). Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa de análisis de imagen de la misma casa comercial Image Lab Version 4.1 (BioRad Laboratories, California, USA).

■ 6.2) Estudio de actividad catalasa en gel

Para valorar la actividad catalasa en el plasma seminal se realizó un estudio de actividad catalasa en gel. Esta técnica fue puesta a punto para este tipo de muestra por considerarla más específica que el uso de los habituales tests comerciales de medición de actividad catalasa.

Se realizaron geles de acrilamida nativos de 1.5 mm al 10% (ver **Tabla 12**).

	Gel separador Vol 2 geles 1.5 mm (20 mL)	Gel concentrador Vol 2 geles 1.5 mm (8 mL)
H₂O	7.2 mL	4.4 mL
Tris HCL 1 M pH 8.8	6 mL	2.4 mL
Acril/Bis 30% 19:1	6.6 mL	1.2 mL
TEMED	20 µL	8 µL
APS 10% 0.1 mg/mL	200 µL	80 µL

Tabla 12: Composición de los geles empleados para valorar actividad catalasa.

Para cada muestra se tomó una pequeña alícuota y se centrifugó a 2000 rpm 4 min para separar el plasma seminal de los espermatozoides. Posteriormente se tomaron 20 µL de plasma seminal y se mezclaron con 5 µL de tampón de carga (ver **Tabla 13**). Los 25 µL resultantes se cargaron en el gel, el cual se corrió durante 3 horas a 120V.

Para 10 mL 4X	
Tampón Tris HCl 0.3M pH 8.8	2.5 mL
Glicerol 80%	4 mL
Azul de bromofenol 1%	1.5 mL
H₂O	2 mL

Tabla 13: Composición del tampón de carga empleado con los geles nativos.

Seguidamente se incubaron los geles durante 25 min con una solución de peróxido de hidrógeno al 0.0105% (Hydrogen Peroxide 30% w/v, Cat No 141076, Panreac Quimica, Barcelona, España) y se revelaron mediante incubación en una solución 1:1 de 1% K-ferricianuro + 1% cloruro férrico (Potassium ferricyanide 99+%, Cat No 223111000, Acros Organics, New Jersey, USA e Iron (III) chloride hexahydrate 99+%, Cat No 217091000, Acros Organics, New Jersey, USA).

Con la reacción de revelado el K-ferricianuro se oxida al reaccionar con el H₂O₂ produciendo K-ferrocianuro el cual en presencia del cloruro férrico da lugar a un precipitado de color azul Prusia, poniéndose todo el gel azul oscuro. En la zona en la que se localiza la catalasa esta degrada el H₂O₂ con lo que la reacción de revelado no puede tener lugar apareciendo una banda incolora. El tamaño de la banda incolora se relaciona positivamente con el nivel de actividad catalasa presente en el plasma seminal.

Se tomaron imágenes de los geles con el dispositivo BIORAD ChemiDoc Molecular Imager XRS+ (BioRad Laboratories, California, USA) con una exposición de 0.1seg y se analizaron con el programa de análisis de imagen de la misma casa comercial Image Lab Version 4.1 (BioRad Laboratories, California, USA).

7) Análisis de expresión de la enzima catalasa en el espermatozoide

Como segunda comprobación de las predicciones de niveles de expresión de los distintos genotipos del SNP CAT C-262T derivadas de los estudios genéticos se realizó un análisis de la presencia del mRNA de la enzima catalasa en el espermatozoide. Para ello se analizaron 90 muestras del grupo de validación de la población infértil.

7.1) Extracción del RNA

Para extraer el RNA de los espermatozoides se empleó el método de extracción mediante Trizol (Trizol LS Reagent, Cat N° 10296-028, Bioline, Life Technologies, California, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante, seguido de un tratamiento con DNAsa para eliminar el posible DNA contaminante y una segunda extracción mediante Trizol.

A 250 µL de muestra se le añadieron 750 µL de Trizol, se homogeneizó y se incubó la mezcla 5 min a temperatura ambiente (RT). Seguidamente se añadieron 200 µL de cloroformo (Chloroform reagent grade, Cat No CL02031000, Scharlab, España), se agitó vigorosamente durante 2min, se incubó durante 5min a RT y se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C. Se recuperó la fase superior incolora y se le añadió 500 µL de 100% isopropanol (Isopropanol 99.5% for molecular biology, Cat N° 327270010, Acros Organics, New Jersey, USA), tras lo cual se incubó 10 min a RT y se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C. Tras descartar el sobrenadante se resuspendió el pellet en 1mL de etanol al 75% y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Los RNAs precipitados y lavados con etanol 75% se centrifugaron a 12000 g durante 10 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se secó el pellet de RNA a RT. Una vez seco, se resuspendió el pellet de RNA en 15 µL de H₂O libre de RNAsas.

Para eliminar el DNA contaminante se trató cada muestra de RNA con DNAsa (DNase I RNase free, Cat N° AM2222, Bioline, Life Technologies, California, USA) (para cada muestra 1 µL DNAsa, 5 µL tampón 10X, 29 µL H₂O libre de RNAsas) incubando durante 30 min a 37°C.

A continuación, se volvió a extraer y precipitar el RNA mediante el mismo método. A los 50 µL de muestra se le añadieron 150 µL de Trizol, se homogeneizó y se incubó la mezcla 5 min a RT. Seguidamente se añadieron 40 µL de cloroformo (Chloroform reagent grade, Cat No CL02031000, Scharlab, España), se agitó vigorosamente durante 2 min, se incubó durante 5 min a RT y se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C. Se recuperó la fase superior incolora y se le añadió 100 µL de 100% isopropanol (Isopropanol 99.5% for molecular biology, Cat N° 327270010, Acros Organics, New Jersey, USA), tras lo cual se incubó 10 min a RT y se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C. Tras descartar el sobrenadante se secó el pellet de RNA a RT. Finalmente, se resuspendió el pellet en 5 µL de H₂O libre de RNAsas.

7.2) Retrotranscripción

Una vez extraído y purificado el RNA, se realizó una retro transcripción para obtener el cDNA correspondiente. Para ello se empleó el kit SensiFast cDNA Synthesis (Sensi Fast cDNA Synthesis Kit, Cat N° BIO-65053, Bioline, Life Technologies, California, USA) con las condiciones de PRC recogidas en la **Tabla 14**:

Reactivos	Ciclos
RNA 5 µL	10 min 25°C
Tampón 5X 4 µL	15 min 42°C
Retrotranscriptasa 1 µL	5 min 85°C
H ₂ O libre de RNAsa 10 µL	Hold 4°C

Tabla 14: Condiciones de la retrotranscripción.

7.3) PCR semicuantitativa

Obtenido el cDNA se realizaron las PCR para amplificar el cDNA de la catalasa. Como el RNA se aisló partiendo de un mismo volumen para todas las muestras se empleó el gen de la protamina 2 para normalizar, realizándose PCR separadas (ver **Tabla 16** y **Tabla 17**). En ambos casos se emplearon primers de diseño propio, diseñados de tal modo que un primer de cada pareja solapase con la unión de exones (ver **Tabla 15**).

Gen	Primer PCR	TM	Producto PCR
CAT	F 5'-GAGCCTACGTCCTGAGTCTC-3' R 5'-CCCTGGCCAGTCTTATAATGG-3'	57°C	165 pb
PRM2	F 5'-CAAGAGGAGCAAGGGCTGAG-3' R 5'-GGTTCTGCAGCCTCTGCGAT-3'	65°C	192 pb

Tabla 15: Primers empleados en las PCR semicuantitativas.

Reactivos	Ciclos
cDNA 5 µL	Desnaturalización inicial 94°C 5 min
Tampón 2.5 µL 10X	40 ciclos:
MgCl ₂ 1 µL 50 mM	Desnaturalización 94°C 30 seg
dNTPs 0.5 µL 10 mM	Anillamiento 57°C 30 seg
Taq polimerasa 0.25 µL 5 U/µL	Extensión 72°C 30 seg
Primer F 0.2 µL 20 µM	Extensión final 72°C 10 min
Primer R 0.2 µL 20 µM	
H ₂ O hasta 25 µL	

Tabla 16: Condiciones de la PCR semicuantitativa para la catalasa.

Reactivos	Ciclos
cDNA 4 µL	Desnaturalización inicial 94°C 5 min
Tampón 2.5 µL 10X	40 ciclos:
MgCl ₂ 1 µL 50 mM	Desnaturalización 94°C 30 seg
dNTPs 0.5 µL 10 mM	Anillamiento 65°C 30 seg
Taq polimerasa 0.25 µL 5 U/µL	Extensión 72°C 20 seg
Primer F 0.2 µL 20 µM	Extensión final 72°C 10 min
Primer R 0.2 µL 20 µM	
H ₂ O hasta 25 µL	

Tabla 17: Condiciones de la PCR semicuantitativa para la protamina 2.

Los productos de las PCR se separaron en geles de agarosa al 2% en tampón TAE. Para poder realizar una comparación objetiva se tomaron imágenes de los geles con el dispositivo UviDoc (UVITEC Cambridge, Cambridge, UK) y se realizó un análisis de imagen con el programa ImageJ 1.50i (ImageJ, National Institutes of Health, USA). Se determinó la intensidad de cada banda y se obtuvo la intensidad de la catalasa normalizada con la de la protamina 2.

7.4) Real time PCR

Una vez realizado el estudio de expresión de la catalasa mediante PCR semicuantitativa se seleccionaron 16 de las muestras incluidas en el mismo, 8 con genotipo CC y 8 con genotipo CT para el polimorfismo CAT C-262T, para realizar con ellas un estudio

mediante PCR a tiempo real con el que poder comparar de un modo más exacto los niveles de expresión de ambos genotipos.

La PCR a tiempo real se realizó en un termociclador LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) empleando el kit comercial LightCycler® 480 SYBR Green I Master (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Cat N° 04707516001, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El protocolo se dividió en tres segmentos: i) desnaturalización inicial 10 min a 95°C, ii) 40 ciclos de 10 seg a 95°C, 15 seg a 57°C y 15 seg a 72°C y iii) curva de disociación. Los datos de fluorescencia se recogieron a 72°C y durante la rampa de 55 a 95°C de la curva de disociación. Se emplearon los mismos primers que para la PCR semicuantitativa (ver **Tabla 15**) y se realizaron 3 replicados para cada muestra y cada gen.

Los cambios relativos en los niveles de expresión de los mRNAs se calcularon mediante el método ΔC_t empleando el Software LightCycler 480 para establecer los parámetros baseline y threshold. Los niveles de expresión del gen diana, CAT, se normalizaron con los del gen PRM2 y los resultados se refirieron empleando el grupo de genotipo CC para la catalasa como control. Finalmente se obtuvieron valores de cuantificación relativa mediante el método $\Delta\Delta C_t$.

8) Análisis de la presencia de prostasomas en los plasmas seminales

En la segunda parte de esta tesis doctoral se realizó un estudio del contenido en prostasomas presente en el plasma seminal, realizándose comparaciones entre muestras normozoospermicas y no normozoospermicas. Para ello se emplearon 50 muestras seminales, siendo la mitad de ellas normozoospermicas y la otra mitad no normozoospermicas de acuerdo con los criterios de la OMS 2010.

8.1) Aislamiento de exosomas de plasma seminal

Los prostasomas presentes en el plasma seminal de las muestras analizadas fueron aislados mediante un protocolo de centrifugación diferencial. Primeramente, las muestras fueron centrifugadas a 500 g durante 10 min para separar los espermatozoides. Seguidamente se centrifugaron los sobrenadantes a 3000 g durante 20 min para retirar posibles restos celulares y cuerpos apoptóticos. Los sobrenadantes recuperados fueron entonces centrifugados a 12000 g durante 20 min para retirar las microvesículas. Finalmente se precipitaron los prostasomas mediante centrifugación a 100000 g durante 70 min.

Para conseguir una mayor pureza los pellets de prostasomas fueron lavados con 20 mL de PBS 1X y vueltos a precipitar mediante centrifugación a 100000 g durante 70 min. Finalmente, cada pellet de prostasomas se resuspendió en 200 µL de PBS 1X.

8.2) Caracterización morfológica

Para caracterizar los aislados de prostasomas a nivel morfológico se emplearon 3 metodologías diferentes: determinación de la concentración proteica, análisis de partículas y análisis mediante microscopía electrónica de transmisión.

A) Determinación de la concentración proteica:

Para determinar la concentración de proteína presente en los aislados de prostasomas se utilizó el kit comercial Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) siguiendo las indicaciones de la propia casa comercial. Para cada muestra se realizaron 2 diluciones, 1:10 y 1:20, se determinó la concentración de proteína de ambas y se calculó la media.

B) Análisis de partículas:

Para todos los aislados de prostasomas se determinaron los parámetros concentración de partículas y diámetros de las partículas mediante el sistema NanoSight (NanoSight, Malvern Instruments, Salisbury, UK). Para esta determinación se preparó una alícuota de cada aislado de prostasomas a dilución. 1:1000.

C) Estudio mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se realizó un estudio de los aislados de prostasomas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello se seleccionaron 4 aislados de prostasomas, 2 provenientes de muestras normozoospermicas y 2 provenientes de muestras no normozoospermicas, y se prepararon alícuotas de 10 μ L las cuales se entregaron en la Unidad de Microscopía del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) donde fue realizado su procesamiento por los técnicos expertos en microscopía.

8.3) Análisis mediante espectrometría de masas de la carga proteica de los prostasomas

Para caracterizar el contenido proteico de los prostasomas se empleó la técnica de espectrometría de masas; los resultados obtenidos se validaron mediante western blot.

A) Preparación de pools

Para poder comparar mediante espectrometría de masas la carga proteica presente en prostasomas aislados de plasma seminal de muestras con distinto diagnóstico se seleccionaron 26 de las 50 muestras incluidas en el estudio de prostasomas, siendo 12 de las muestras normozoospermicas de acuerdo con los criterios de la OMS 2010 y 14 no normozoospermicas. Con esas muestras se prepararon 7 pooles de modo que cada uno contase con 2 o 4 muestras con la misma patología. De los 7 pooles, 3 se realizaron con muestras con diagnóstico normozoospermico mientras que los 4 restantes se formaron con muestras con diagnóstico no normozoospermico. Cada pool se preparó para obtener una cantidad total de 100 μ g de proteína de modo que cada una de las muestras incluidas en el pool aportase la misma cantidad de proteína.

B) Digestión proteica (Gel concentrador)

Se prepararon geles convencionales para SDS-PAGE de 0.75 mm (concentrador al 4% y separador al 10%). Los pooles de prostasomas se cargaron en el gel y se dejaron correr hasta que el frente de la carrera alcanzó una distancia de 3 mm en el gel separador de

modo que el conjunto de proteínas de cada muestra quedase concentrado en la interfaz entre ambas partes del gel. Las bandas resultantes de proteínas concentradas fueron visualizadas mediante tinción de azul de Coomassie, cortadas y separadas del resto del gel. Seguidamente las bandas asiladas fueron desteñidas con una solución 1:1 ACN:H₂O y las proteínas reducidas y alquiladas (los puentes disulfuro de los residuos cisteína se redujeron con un tratamiento con 10 mM DTT durante 1h a 56°C mientras que los grupos tiol se alquilaron con tratamiento con 50mM iodoacetamida durante 1h a temperatura ambiente en oscuridad). A continuación, se realizó una digestión de las proteínas con tripsina (Promega, Madison, USA) según el protocolo descrito por Shevchenko *et al.* (1996) (164): se deshidrataron las bandas por vacío y se rehidrataron con 50 mM bicarbonato amónico pH 8.8 y 60 g/μL de tripsina a ratio 5:1 proteína:tripsina, se mantuvieron en hielo durante 2h y a continuación se incubaron a 37°C durante 12 horas para finalmente parar la reacción añadiendo 1% TFA. Los sobrenadantes se secaron y desalaron.

C) Análisis cualitativo

Los productos desalados de la digestión proteica fueron resuspendidos en 10μL de 0.1% ácido fórmico y analizados mediante RP-LC-MS/MS en un sistema Easy-nLC II acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap-Velos-Pro (Thermo Scientific). Los péptidos fueron concentrados mediante cromatografía de fase reversa usando una columna de 0.1 mm x 20 mm C18 (Thermo Scientific) y separados mediante una columna 0.075 mm x 250 mm C18 (Thermo Scientific) operando a 0.3 μL/min. Seguidamente los péptidos fueron eluidos con un gradiente dual de 180 min: de 5 a 25% solvente B 120 min y de 25 a 40% solvente B 60 min (Solvente A: ácido fórmico 0.1% en agua; solvente B: ácido fórmico 0.1%, acetonitrilo 80% en agua). La ionización se realizó utilizando un equipo Nano-bore emitters Stainless Steel ID 30 μm (Proxeon). Se ajustó la resolución orbital a 30000.

Los péptidos fueron detectados en survey scans de 400 a 1600 amu (1μscan) con una amplitud de aislamiento de 2u (en unidades masa/carga), energía normalizada de colisión del 35% y exclusión dinámica aplicada durante periodos de 30seg. La identificación de los péptidos se realizó mediante el algoritmo SEQUEST (Proteome Discoverer 1.4, Thermo Scientific) empleando la base de datos uniprot-homo.fasta.

D) Análisis cuantitativo simple (Itraq Labelling)

Los productos de digestión proteica fueron marcados con el kit iTRAQ reagent 8plex Multi-plex (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo de Köcher *et al.* (2009) (165): se disolvieron los péptidos en bicarbonato de trietilamonio 0.5 M ajustando el pH a 8 y los reactivos iTRAQ en 50 μL de isopropanol, se mezclaron ambas soluciones y se incubaron 2h a temperatura ambiente. La reacción se paró con ácido fórmico al 0.1% y las mezclas fueron secadas y mezcladas para obtener la mezcla “8plex”.

La mezcla “8plex” fue desalada, secada, resuspendida en 10 μL de ácido fórmico al 0.1% y analizada mediante RP-LC-MS/MS en un sistema Easy-nLC II acoplado a un

espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap-Velos-Pro (Thermo Scientific). Los péptidos fueron concentrados mediante cromatografía de fase reversa usando una columna de 0.1 mm x 20 mm C18 (Thermo Scientific) y separados mediante una columna 0.075 mm x 250 mm C18 (Thermo Scientific) operando a 0.3 μ L/min. Seguidamente los péptidos fueron eluidos con un gradiente dual de 60 min: de 5 a 25% solvente B 180 min y de 25 a 40% solvente B 60 min (Solvente A: ácido fórmico 0.1% en agua; solvente B: ácido fórmico 0.1%, acetonitrilo 80% en agua). La ionización se realizó utilizando un equipo Nano-bore emitters Stainless Steel ID 30 μ m (Proxeon).

Los péptidos fueron detectados en survey scans de 400 a 1600 amu (1 μ scan) con una amplitud de aislamiento de 2u (en unidades masa/carga), energía normalizada de colisión del 40% y exclusión dinámica aplicada durante periodos de 30 seg. Se rechazaron los precursores de carga desconocida o +1. La identificación de los péptidos se realizó mediante el algoritmo SEQUEST (Proteome Discoverer 1.4, Thermo Scientific) empleando la base de datos uniprot-homo.fasta. Todas las proteínas se identificaron con al menos 2 péptidos de alta confianza.

La cuantificación de los péptidos marcados con los reactivos iTRAQ se realizó con el programa Proteome Discoverer 1.4. Para determinar los ratios se emplearon correcciones Quan Value y para la cuantificación proteica se consideraron solo grupos de proteínas con péptido único.

E) Análisis de resultados

Las proteínas identificadas fueron clasificadas de acuerdo a sus categorías Gene Ontology para función molecular, proceso biológico y componente celular (www.geneontology.org). Se realizaron comparaciones entre pools a nivel cualitativo mediante el programa FunRich (<http://www.funrich.org>). Las posibles interacciones entre proteínas se determinaron mediante la herramienta informática STRING Database (<https://string-db.org/>).

8.4) Validación de los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas

Para validar los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas se seleccionaron 2 proteínas de entre aquellas que mostraron niveles de expresión diferencial en función de si se localizaban en prostasomas aislados de muestras seminales normozoospermicas o de prostasomas aislados de muestras seminales no normozoospermicas. Las proteínas seleccionadas fueron la lactato deshidrogenasa C (LDHC) y la hexokinasa 1 (HK1), ambas proteínas subexpresadas en prostasomas aislados de muestras seminales no normozoospermicas en base a los resultados de espectrometría de masas. Los niveles de expresión de ambas proteínas en los prostasomas se determinaron mediante western blot.

Específicamente, se prepararon 4 pools de prostasomas, 2 para prostasomas aislados de muestra seminal normozoospermica y 2 para prostasomas aislados de muestra seminal no normozoospermica. De los 2 pools de cada tipo, 1 pool se formó juntando los pools previamente empleados para la espectrometría de masas mientras que el segundo

pool se formó con aislados de prostasomas no empleados en la espectrometría de masas. Todos los pools se ajustaron para obtener una concentración de proteína de 3 µg/µL.

10 µl de cada pool de mezclaron con 2.5 µL de tampón RIPA casero (ver **Tabla 18**) enriquecido con inhibidores de proteasas (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Cat No 000000011697498001, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), se sometieron a un tratamiento de 3 min de ultrasonidos a máxima potencia y se incubaron en hielo durante 15 min. Seguidamente se empleó el protocolo de western blot descrito en el apartado “Análisis de expresión de catalasa mediante western blot”, empleando geles al 10% para la LDHC (36KDa) y al 8% para la HK1 (102KDa). Los anticuerpos primarios empleados fueron: LDHC polyclonal antibody (Cat N° PA5-30079, Thermo Fisher Scientific, Brawnschweig, Alemania) y HK1 Polyclonal antibody (Cat N° PA5-15447, Thermo Fisher Scientific, Brawnschweig, Alemania), ambos a concentración 1:5000; como secundario se empleó el anticuerpo goat anti-rabbit IgG-HRP (Cat No sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), también a concentración 1:5000.

También se realizó una validación empleando por separado las 8 muestras de los segundos pools, los formados con aislados de prostasomas no empleados en la espectrometría de masas, ajustando las concentraciones de cada muestra a 1.2 µg/µL.

En estas validaciones no se empleó control interno ya que no por el momento no existe ninguna proteína identificada en prostasomas cuya expresión se considere estable.

Reactivo	Concentración final
Hepes (pH=7.4)	20 mM
NaCl	100 mM
NaF	100 mM
EDTA	5 mM
Triton-X100	1%
Ortovonadato sódico	1 mM
Inhibidores de proteasas	1X

Tabla 18: Composición tampón RIPA.

8.5) Análisis del contenido en DNA de los prostasomas

Para comparar la carga de DNA presente en los prostasomas se seleccionaron 2 de los pools antes mencionados (ver apartado 8.3.a del Material y métodos), uno de ellos formado por prostasomas aislados a partir de muestras seminales normozoospermicas y el otro formado por prostasomas aislados a partir de muestras seminales no normozoospermicas.

Ambos pools (100µg proteína/pool) se sometieron a una extracción de DNA mediante el kit comercial Qiazol Lysis Reagent (Qiazol Lysis Reagent, Cat N° 79306, Quiagen, Mainz, Alemania). El DNA obtenido se cuantificó mediante NanoDrop y mediante la herramienta BioAnalyzer (High Sensitivity DNA Analysis Chip, Cat N° 5067-4626, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). A continuación se prepararon librerías de

DNA mediante el kit comercial NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit para Illumina (NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit , Cat N° E7645S, New England BioLabs, UK) y se secuenció mediante un secuenciador Illumina Nextseq Sequencer. Estos pasos fueron realizados en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid.

Por últimos, las secuencias obtenidas en ambos pooles se mapearon en los cromosomas humanos empleando los programas informáticos BWA 0.7.1, SAMTOOLS 1.3.1, PICARD 2.2.1 y GATK 3.7 y el genoma de referencia humano Homo_sapiens.GRCh38.dna.toplevel.fa. Este procedimiento fue realizado en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA).

9) Análisis estadístico

Los análisis estadísticos pertinentes se realizaron utilizando el paquete de software estadístico SPSS 22 (SPSS Inc., Chicago. USA). Las asociaciones entre variables categóricas (frecuencias genotípicas y ODDS ratios) se determinaron mediante el test Chi-cuadrado. Las variables continuas (parámetros del seminograma e intensidades de imagen) se compararon mediante tests no paramétricos: Mann-Whitnet U-test para comparar entre 2 grupos y Kruskal-Wallis test para comparar entre más de 2 grupos. Se consideró como estadísticamente significativo un P valor <0.05. Las correlaciones entre variables (cantidad y actividad catalasa) se determinaron mediante el test Rho de Spearman.

Para las representaciones gráficas de los resultados obtenidos se emplearon las siguientes herramientas:

Gráficas de barras → frecuencias.

Diagramas de cajas y bigotes → valores del seminograma.

Forest plot → riesgos de infertilidad.

Diagramas de dispersión → cantidades y actividades enzimáticas.

Diagramas circulares → clasificaciones de proteínas.

Heat map → comparar los niveles de expresión proteica .

Diagramas de Vann → comparar las cantidades de proteínas identificadas en diferentes estudios.

10) Recursos informáticos

BioEdit v7.0.5 (Ivis therapeutics, Carlsbag, USA) → análisis de secuencias para confirmar los genotipos obtenidos mediante RFLP y PCR multiplex.

TFBind (<http://tfbind.hgc.jp/>) → estudio de unión de factores de transcripción al promotor del gen de la catalasa.

Image Lab v4.1 (BioRad Laboratories, California, USA) → análisis de imagen de geles de actividad y western blot.

ImageJ 1.50i (ImageJ, National Institutes of Health, USA) → análisis de imagen de geles de electroforesis.

GO Classification (www.geneontology.org) → clasificación de proteínas en categorías.

FunRich (<http://www.funrich.org>) → comparaciones proteómicas cualitativas.

STRING Database (<https://string-db.org/>) → análisis de interacciones entre proteínas.

RESULTADOS

1) Análisis descriptivo de la población

Para tener una idea de las características de la población muestral estudiada se realizó un primer análisis descriptivo de la misma. En este análisis se estudió en primer lugar la distribución de los parámetros seminales en la población muestral tanto agrupada como dividida en cohortes. En segundo lugar se realizó en la población muestral completa un estudio de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos incluidos en la tesis.

1.1) Parámetros seminales

En el análisis descriptivo de la población muestral completa (393 muestras) se observa que ésta se situaría por encima de los valores referencia de la OMS para todos los parámetros del seminograma clásico según los criterios de la OMS más recientes (2010) (ver **Tabla 19**). Además, llaman la atención 2 parámetros: la concentración para la cual la media de la población muestral estudiada duplica el valor mínimo de referencia de la OMS (32 mill/mL vs 15 mill/mL respectivamente) y la morfología para la cual la población estudiada únicamente supera el valor referencia de la OMS por una centésima (4.01% vs 4% respectivamente).

	Volumen (mL)	Concentración (mil/mL)	Motilidad progresiva (%)	Morfología (%)	Fragmen tación (%)	Estrés Oxidativo (%)
Media	3.30	32.35	42.07	4.01	19.69	43.10
Varianza	1.76	458.75	166.77	4.83	173.14	
Desv. standart	1.32	21.41	12.91	2.19	13.15	
Rango	8.6	149.97	74.0	14.0	79.00	

Tabla 19: Análisis descriptivo de la población muestral completa (393 muestras) para los valores incluidos en el seminograma tradicional. El valor de estrés oxidativo refleja la frecuencia de muestras con alto nivel de estrés oxidativo (N3+N4).

Al realizar el análisis descriptivo de la población agrupada en las 2 subpoblaciones estudiadas, pacientes (313) y donantes de fertilidad probada (80), se observa que las dos subpoblaciones presentan valores por encima de los valores referencia de la OMS para todos los parámetros incluidos en el seminograma clásico a excepción de la morfología, para la cual la cohorte de pacientes está por debajo del valor referencia de la OMS (3.40% vs 4% respectivamente) (ver **Tabla 20**). Por otra parte, también se observa como los valores difieren entre las 2 subpoblaciones, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas para los tres parámetros principales: concentración, motilidad y morfología. En concreto, es la cohorte de pacientes la que presenta los valores peores y más semejantes a los de la población completa para los tres parámetros (ver **Figura 7**). Por su parte la cohorte de donantes, tal y como cabía esperar, presenta valores mucho mejores que la población completa. Como excepción a estas observaciones tenemos los valores del volumen de la muestra, valores que son muy similares tanto al comparar pacientes con donantes como al comparar ambas cohortes con la población completa.

		Motilidad					Estrés
		Volumen	Concentración	progresiva	Morfología	Fragmentación	_oxidativo
		(mL)	(mill/mL)	(%)	(%)	(%)	(%)
Pacientes	Media	3.33	26.93	38.92	3.40	19.69	43.50
	Varianza	1.85	339.28	149.48	3.51	173.14	
	Desv. estandart	1.36	18.92	12.22	1.87	13.15	
	Rango	8.6	104.97	69.00	9.00	79.00	
Donantes	Media	3.19	53.82	54.55	6.40		41.80
	Varianza	1.43	357.99	40.50	2.93		
	Desv. estandart	1.19	18.92	6.36	1.71		
	Rango	6.5	118.00	30.0	11.0		
P-value		0.431	<0.001	<0.001	<0.001		0.788

Tabla 20: Análisis descriptivo de la población muestral para los valores incluidos en el seminograma tradicional. Los valores aparecen clasificados en función del tipo de subpoblación (pacientes (313) o donantes (80)). El valor de estrés oxidativo refleja la frecuencia de muestras con alto nivel de estrés oxidativo (N3+N4).

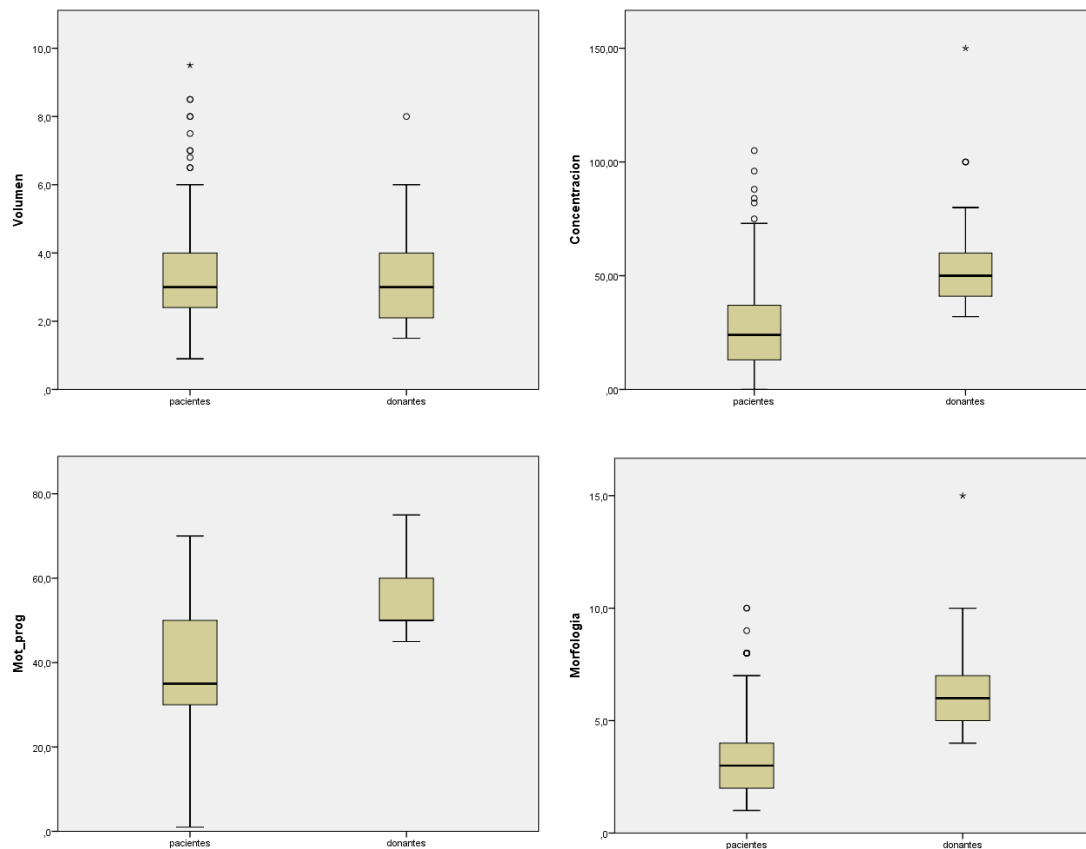


Figura 7: Diagramas de cajas y bigotes para las cohortes pacientes y donantes y los parámetros volumen, concentración, motilidad progresiva y morfología.

Se compararon también los valores medios del seminograma obtenidos al agrupar la población muestral en base a su diagnóstico general en muestra normozoospermica (174) o muestra no normozoospermica (219) (ver **Tabla 21** y **Figura 8**). En este caso se observa nuevamente que en ambas poblaciones los valores se encuentran por encima de los valores referencia de la OMS para todos los parámetros a excepción de la morfología, para la cual el grupo con patología se encuentra por debajo del valor referencia de la OMS (2.52% vs 4% respectivamente). No obstante, cabe destacar que los mejores valores aparecen siempre en las muestras normozoospermicas y que hay parámetros para los cuales aun estando dentro de la normalidad las muestras con alguna patología presentan una media muy por debajo de la de las muestras normozoospermicas (concentración 21.28 vs 46.37 mill/mL respectivamente y motilidad progresiva 35.40 vs 50.52% respectivamente), observándose en la mayoría de los casos diferencias estadísticamente significativas entre ambas subpoblaciones. También es interesante destacar que contrariamente a lo esperado las muestras normozoospermicas presentan niveles de estrés oxidativo ligeramente superiores a las no normozoospermicas. Por otra parte, a la hora de interpretar estos resultados hay que considerar que dentro de las muestras no normozoospermicas se incluyen tanto muestras que presentan varios parámetros alterados como otras que presentan únicamente un parámetro afectado estando el resto de parámetros dentro de la normalidad, incluso con buenos valores, por lo que al agrupar todas las muestras no normozoospermicas se compensarían unos valores con otros.

		Motilidad					
		Volumen (mL)	Concentración (mil/mL)	progresiva (%)	Morfología (%)	Fragmentación (%)	Estres
Normos	Media	3.18	46.37	50.52	5.89	16.46	43.40%
	Varianza	1.24	399.85	80.54	2.76	125.28	
	Desv estandard	1.11	19.99	8.97	1.66	11.19	
	Rango	6.50	134.00	40.00	11.00	69.00	
No normos	Media	3.40	21.28	35.40	2.52	21.07	42.90%
	Varianza	2.16	228.13	134.30	1.45	187.91	
	Desv estandard	1.47	15.10	11.58	1.20	13.70	
	Rango	8.60	74.97	69.00	7.00	77.33	
P-value		0.203	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.932

Tabla 21: Análisis descriptivo de la población muestral para los valores incluidos en el seminograma tradicional. Los valores aparecen clasificados en función del diagnóstico general proporcionado por el seminograma clásico (normozoospermia (173) o no normozoospermica (219)). El valor de estrés oxidativo refleja la frecuencia de muestras con alto nivel de estrés oxidativo (N3+N4).

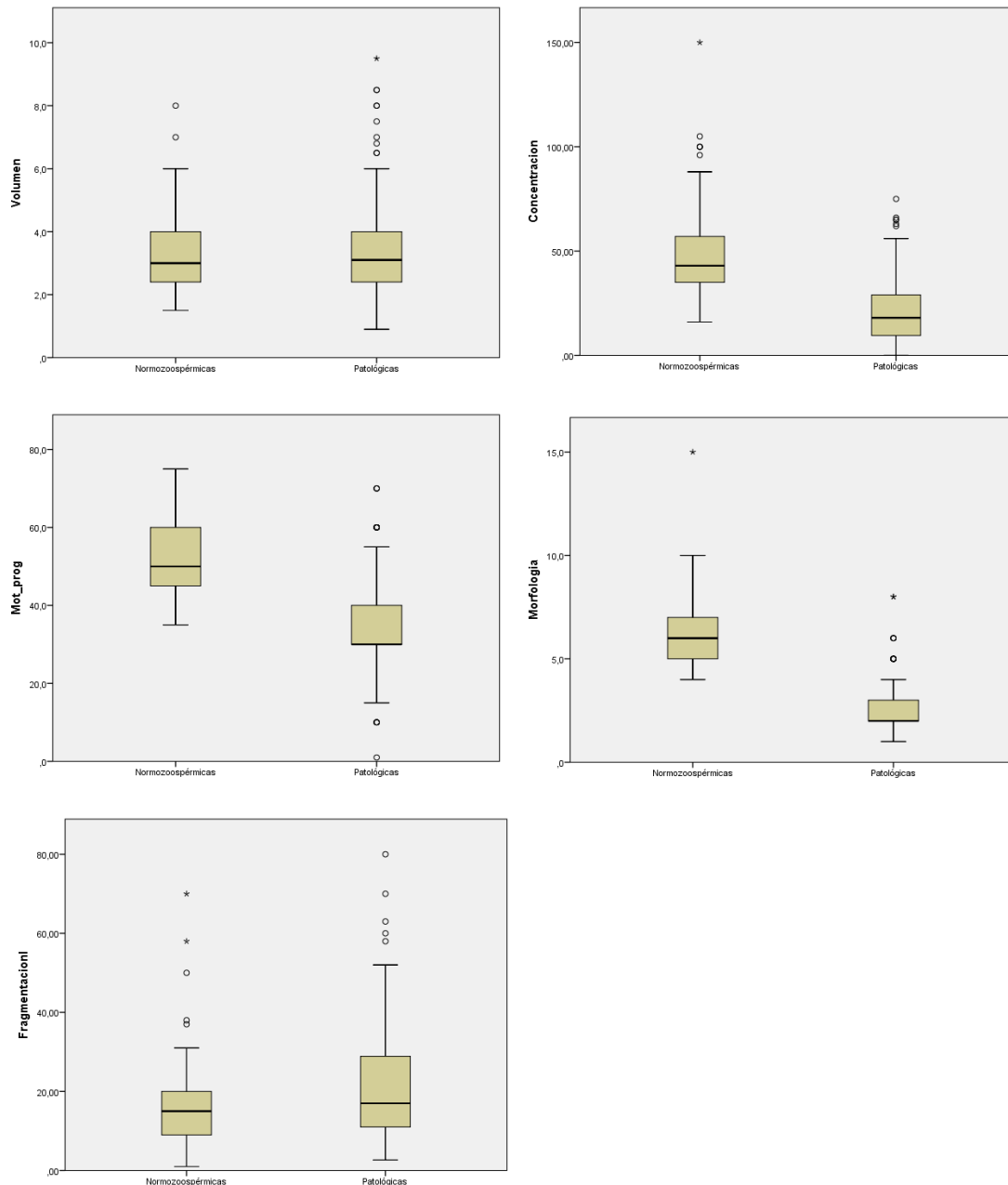


Figura 8: Diagramas de cajas y bigotes para las muestras agrupadas en normozoospermicas y no normozoospermicas y los parámetros volumen, concentración, motilidad progresiva, morfología y fragmentación.

1.2) Frecuencias genotípicas

Se realizó el análisis descriptivo de las frecuencias genotípicas observadas (ver **Tabla 22** y **Figura 9**) para los 8 polimorfismos caracterizados observándose que en nuestra población no existe variación polimórfica para el SNP SOD2 Ile54Thr, apareciendo únicamente el genotipo Thr/Thr. Para el resto de los SNPs estudiados se han encontrado todas las variantes genotípicas si bien en la mayoría de los casos el homocigoto variante aparece con frecuencia muy inferior a los otros dos genotipos (a excepción del SNP SOD2 rs4880). Se observa que los SNPs XRCC1 Arg399Gln y GPX Pro200Leu presentan frecuencias genotípicas muy similares siendo en ambos casos las frecuencias

de los genotipos salvaje y heterocigoto similares. Por su parte los polimorfismos OGG1 Ser326Cys y CAT C-262T muestran una frecuencia para el genotipo salvaje muy superior a la del heterocigoto, incluso más del doble en el caso del SNP de la catalasa. En el caso de las GST, la GSTT muestra una frecuencia de la variante normal del 79% mientras que la GSTM muestra frecuencias similares para las variantes normal y nula.

	Genotipo	N (obs)	Frecuencia
HOGG1 Ser326Cys	Ser/Ser	236	0.59
	Ser/Cys	142	0.37
	Cys/Cys	15	0.04
XRCC1 Arg399Gln	Arg/Arg	167	0.43
	Arg/Gln	173	0.44
	Gln/Gln	53	0.13
SOD2 Ile54Thr	Thr/Thr	393	1.00
	Ile/Thr	0	0.00
	Ile/Ile	0	0.00
SOD2 Ala16Val	Ala/Ala	81	0.21
	Ala/Val	195	0.49
	Val/Val	117	0.30
CAT C-262T	CC	255	0.65
	CT	119	0.30
	TT	19	0.05
GPX1 Pro200Leu	Pro/Pro	171	0.43
	Pro/Leu	175	0.45
	Leu/Leu	47	0.12
GSTT	Normal	309	0.79
	Nula	84	0.21
GSTM	Normal	193	0.49
	Nula	200	0.51

Tabla 22: Frecuencias genotípicas observadas para el conjunto de la población.

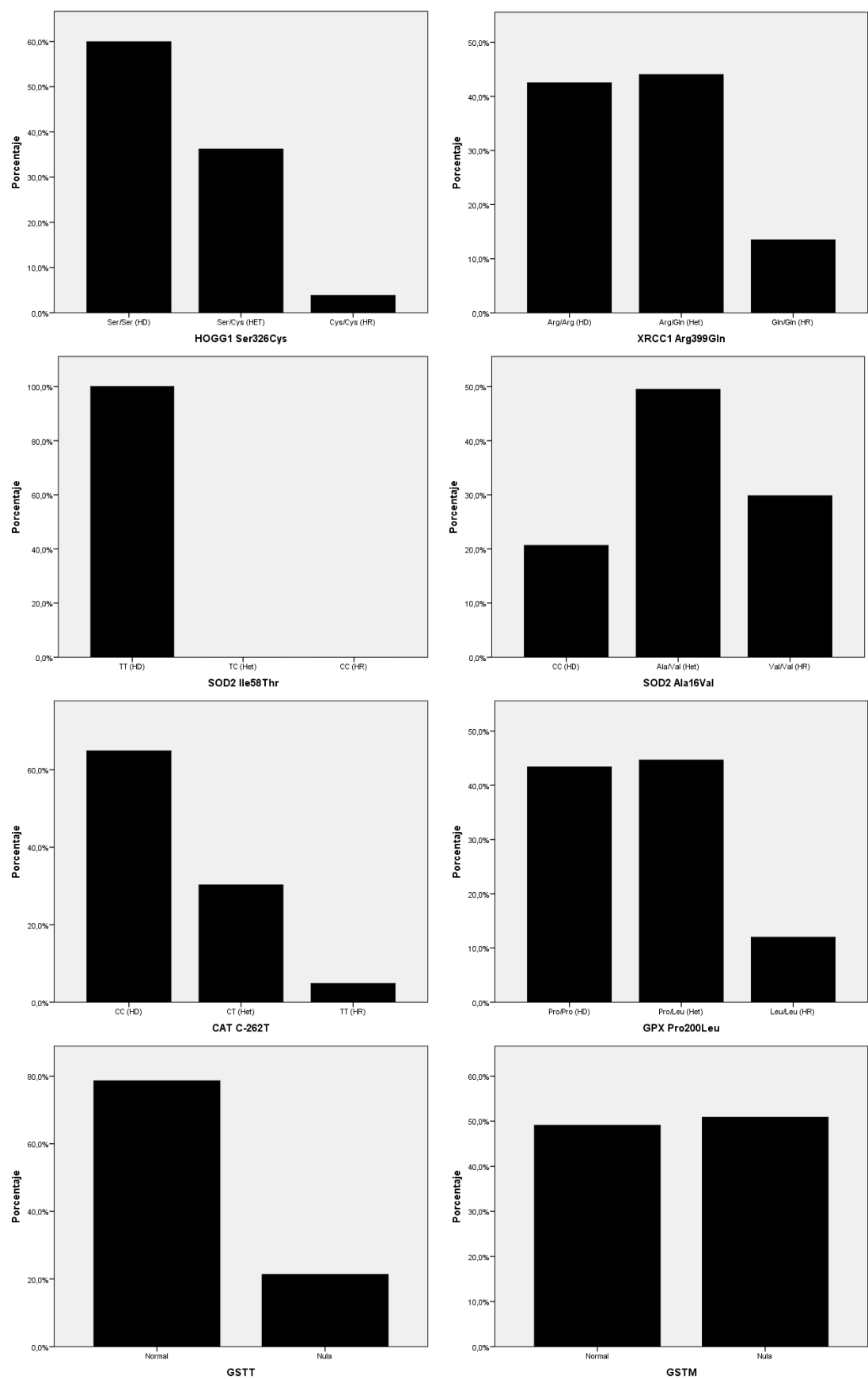


Figura 9: Gráficos que muestran las frecuencias de los distintos genotipos en la población completa para los polimorfismos estudiados.

2) Análisis genotípico de la población

En el primer bloque de esta tesis, el centrado en la búsqueda de marcadores de infertilidad masculina a nivel genético, se realizó un estudio de frecuencias genotípicas para 6 polimorfismos tipo SNP presentes en genes codificantes para enzimas de reparación o enzimas antioxidantes y 2 variantes nulas de enzimas antioxidantes. Los resultados obtenidos en este bloque se muestran organizados según el tipo de enzima: primero se muestran los resultados para los 2 polimorfismos localizados en genes codificantes para enzimas de reparación y después se muestran los resultados para el resto de polimorfismos y variantes, localizados todos ellos en genes codificantes para enzimas antioxidantes.

2.1) Análisis genotípico para las enzimas de reparación

En esta tesis se ha estudiado la relación de dos polimorfismos, localizados en dos genes codificantes para dos enzimas de reparación del DNA de la ruta BER, OGG1 Ser326Cys y XRCC1 Arg399Gln, con la aparición de infertilidad masculina.

Al comparar las frecuencias genotípicas entre pacientes infértiles y donantes de fertilidad probada se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el SNP XRCC1 Arg399Gln ($\chi^2(2)=8.7$, $P=0.013$) pero no para el OGG1 Ser326Cys (ver **Tabla 23**). En concreto, para el SNP XRCC1 Arg399Gln se observó que los pacientes mostraban frecuencias similares para los genotipos Arg/Arg y Arg/Gln mientras que en donantes la frecuencia del genotipo heterocigoto fue prácticamente el doble que la del genotipo Arg/Arg. La frecuencia del homocigoto Gln/Gln fue similar en ambos grupos (ver **Figura 10**).

En el caso del SNP OGG1 Ser326Cys no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias genotípicas entre ambas cohortes, aunque si se observa un ligero incremento de la frecuencia del homocigoto Ser/Ser en donantes.

Genotipo	Pacientes		Donantes		P-value
	N (obs)	Frecuencia genotípica	N (obs)	Frecuencia genotípica	
OGG1 Ser326Cys					
Ser/Ser	182	0.59	53	0.66	0.455
Ser/Cys	118	0.37	25	0.32	
Cys/Cys	13	0.04	2	0.02	
XRCC1 Arg399Gln					
Arg/Arg	143	0.46	22	0.28	0.013
Arg/Gln	129	0.41	45	0.56	
Gln/Gln	40	0.13	13	0.16	

Tabla 23: Comparación de frecuencias genotípicas entre pacientes y donantes para los SNPs OGG1 Ser326Cys y XRCC1 Arg399Gln. P-value obtenido mediante el test Chi-cuadrado.

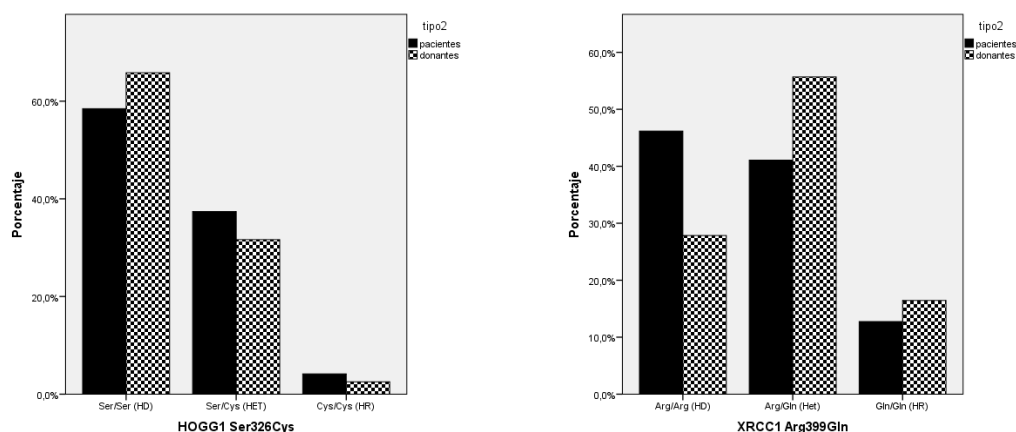


Figura 10: Gráficos de barras que muestran las frecuencias genotípicas para los SNPs OGG1 Ser326Cys y XRCC1 Arg399Gln en las 2 cohortes estudiadas, pacientes infértiles y donantes fértiles.

En concordancia con los resultados observados al analizar las frecuencias genotípicas, al estudiar los odds ratio de padecer infertilidad para los distintos genotipos enfrentados a la suma de los 2 genotipos restantes, se obtuvieron diferencias significativas para los genotipos Arg/Arg y Arg/Gln del SNP XRCC1 Arg399Gln (OR=2.223, 95% CI=1.296-3.813, $\chi^2(1)=8.67$, $P=0.003$ y OR=0.555, 95%CI=0.337-0.912, $\chi^2(1)=5.47$, $P=0.019$ respectivamente) (Ver **Figura 11**). Por el contrario, para el SNP OGG1 Ser326Cys fue el Cys/Cys el genotipo que presentó el mayor odds ratio de infertilidad (OR=1.668).

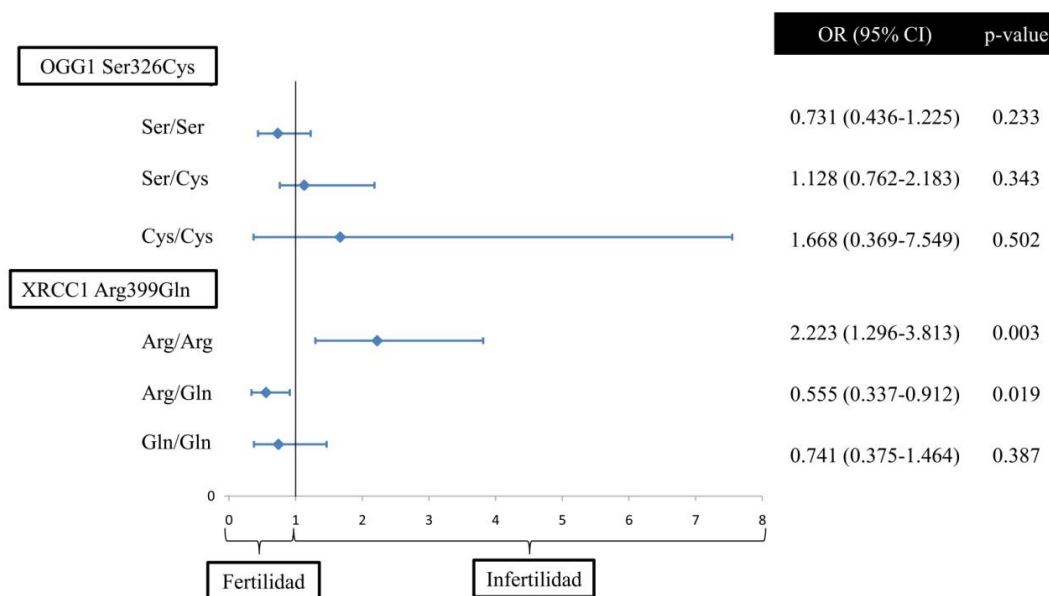


Figura 11: Forest plot que muestra los odds ratio para infertilidad según genotipos para los SNPs OGG1 Ser326Cys y XRCC1 Arg399Gln. Los rombos representan los OR mientras que las líneas horizontales representan los 95%CI. La línea vertical marca el valor nulo (OR=1). P-value calculado mediante el test Chi-cuadrado.

Al comparar los valores medios de los parámetros del seminograma clásico entre genotipos (ver **Tabla 24**) se obtuvieron diferencias significativas para el parámetro

concentración en el SNP XRCC1 Arg399Gln ($H=8.43$, $P=0.015$). El análisis por parejas con significaciones ajustadas reveló diferencias significativas entre los dos genotipos homocigotos ($H=-43.23$, $P=0.047$, $r=-0.131$) y casi significativas entre los genotipos Arg/Arg y Arg/Gln ($H=-28.98$, $P=0.056$, $r=-0.159$).

		Genotipos			p-value
OGG1 Ser326Cys		Ser/Ser	Ser/Cys	Cys/Cys	
	Volumen (mL)	3.38	3.21	2.90	0.266
	Concentración (mill/mL)	33.09	31.29	30.33	0.538
	Motilidad (%)	42.88	41.15	38.66	0.269
	Morfología (%)	4.20	3.73	3.66	0.056
	Vitalidad (%)	75.55	72.29	71.60	0.280
	Fragmentación (%)	19.19	20.44	19.87	0.688
	Estrés oxidativo	43.60	43.70	33.30	0.733
XRCC1 Arg399Gln		Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	
	Volumen (mL)	3.29	3.29	3.34	0.957
	Concentración (mil/mL)	28.81	33.99	38.09	0.015
	Motilidad (%)	40.92	42.20	45.28	0.159
	Morfología (%)	3.89	4.04	4.30	0.408
	Vitalidad (%)	73.22	74.33	75.76	0.666
	Fragmentación (%)	19.46	20.50	17.86	0.641
	Estrés oxidativo	42.20	45.10	39.60	0.741

Tabla 24: Comparación según genotipos de los SNPs OGG1 Ser326Cys y XRCC1 Arg399Gln de los valores medios obtenidos para cada parámetro en el seminograma clásico. P-values obtenidos mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis para los parámetros volumen, concentración, motilidad, morfología, vitalidad y fragmentación. El parámetro estrés oxidativo aparece reflejado como la frecuencia de casos con niveles altos de estrés oxidativo (N3+N4) y su P-value se calculó con el test Chi-cuadrado.

Para el SNP OGG1 Ser326Cys, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ningún parámetro sí que se observaron diferencias casi significativas para el parámetro morfología para el cual el genotipo Ser/Ser presentó el mejor valor. Además, aunque con diferencias menos notables, en el resto de los parámetros tradicionales se mantiene el Cys/Cys como el genotipo con peores valores y el Ser/Ser con los mejores, observaciones que encajan con lo esperado a partir del estudio de odds ratios de infertilidad.

Finalmente se realizó una comparación directa entre donantes, pacientes con diagnóstico normozoospermicos y pacientes con diagnóstico no normozoospermico (ver **Tabla 25**).

		Genotipo			p-value
OGG1 Ser326Cys		Ser/Ser	Ser/Cys	Cys/Cys	
	Donantes	0.66	0.32	0.02	0.002
	Pacientes normozoospermicos	0.74	0.24	0.02	
	Pacientes no normozoospermicos	0.52	0.43	0.05	
XRCC1 Arg399Gln		Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	
	Donantes	0.28	0.56	0.16	0.006
	Pacientes normozoospermicos	0.50	0.33	0.17	
	Pacientes nonormozoospermicos	0.44	0.45	0.11	

Tabla 25: Comparación de frecuencias genotípicas para los SNPs OGG1 Ser326Cys y XRCC1 Arg399Gln entre donantes, pacientes con diagnóstico normozoospermicos y pacientes con diagnóstico no normozoospermico. P value obtenido mediante el test Chi-cuadrado.

Para el SNP OGG1 Ser326Cys se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias genotípicas entre pacientes con diagnóstico normozoospermicos y pacientes con diagnóstico patológico, con un incremento importante de la frecuencia del genotipo heterocigoto en los pacientes con el seminograma no normozoospermico. En cambio, no se obtuvieron diferencias significativas entre donantes y pacientes normozoospermicos.

Para el SNP XRCC1 Arg399Gln se obtuvieron diferencias significativas al comparar donantes con pacientes normozoospermicos pero no al comparar entre pacientes normozoospermicos y no normozoospermicos. En concreto, se observó un incremento muy importante (casi el doble) de la frecuencia del genotipo homocigoto Arg/Arg en pacientes en comparación con los donantes (0.28 vs 0.56 respectivamente). Estos resultados están en línea con lo observado tanto en el análisis de odds ratio como al estudiar los valores del seminograma en los que también se obtuvo peores resultados para el genotipo homocigoto Arg/Arg.

2.2) Análisis genotípico para las enzimas antioxidantes

En la presente tesis se ha estudiado la relación de cuatro polimorfismos localizados en tres genes codificantes para enzimas de defensa antioxidante, SOD2 Ile58Thr, SOD2 Ala16Val, CAT C-262T y GPX Pro200Leu, con la aparición de infertilidad masculina. Así mismo también se estudió dicha relación para dos variantes nulas de dos enzimas de la familia de la GST, GSTT1 y GSTM1.

Al comparar las frecuencias genotípicas entre pacientes infértiles y donantes de fertilidad probada, se encontraron diferencias significativas únicamente para el SNP

CAT C-262T ($\chi^2(2)= 10.68$, $p=0.002$). Para dicho SNP el grupo de los donantes de fertilidad probada mostró una frecuencia genotípica para el genotipo heterocigoto CT prácticamente del doble que el grupo de los pacientes infértiles (ver **Tabla 26** y **Figura 12**).

Genotipo	Pacientes		Donantes		P-value
	N (obs)	Frecuencia genotípica	N (obs)	Frecuencia genotípica	
Sod2 Ile58Thr					
Thr/Thr	313	1.00	80	1.00	
Ile/Thr	0	0.00	0	0.00	0
Ile/Ile	0	0.00	0	0.00	
Sod2 Ala16Val					
Ala/Ala	69	0.22	12	0.15	
Ala/Val	150	0.48	45	0.56	0.329
Val/Val	94	0.30	23	0.29	
CAT C-262T					
CC	215	0.69	40	0.50	
CT	82	0.26	37	0.47	0.002
TT	16	0.05	3	0.03	
GPX1 Pro200Leu					
Pro/Pro	139	0.44	31	0.39	
Pro/Leu	138	0.44	38	0.47	0.669
Leu/Leu	36	0.12	11	0.14	
GSTT1					
Wild	246	0.79	63	0.78	
Null	67	0.21	17	0.22	0.975
GSTM1					
Wild	151	0.48	43	0.53	
Null	162	0.52	37	0.47	0.420

Tabla 26: Frecuencias genotípicas para los polimorfismos SOD2 Ile58Thr, SOD2 Ala16Val, CAT C-262Ty GPX Pro200Leu y para las variantes nulas de dos enzimas de la familia de la GST, GSTT1 y GSTM1. P-value calculado mediante el test Chi-cuadrado.

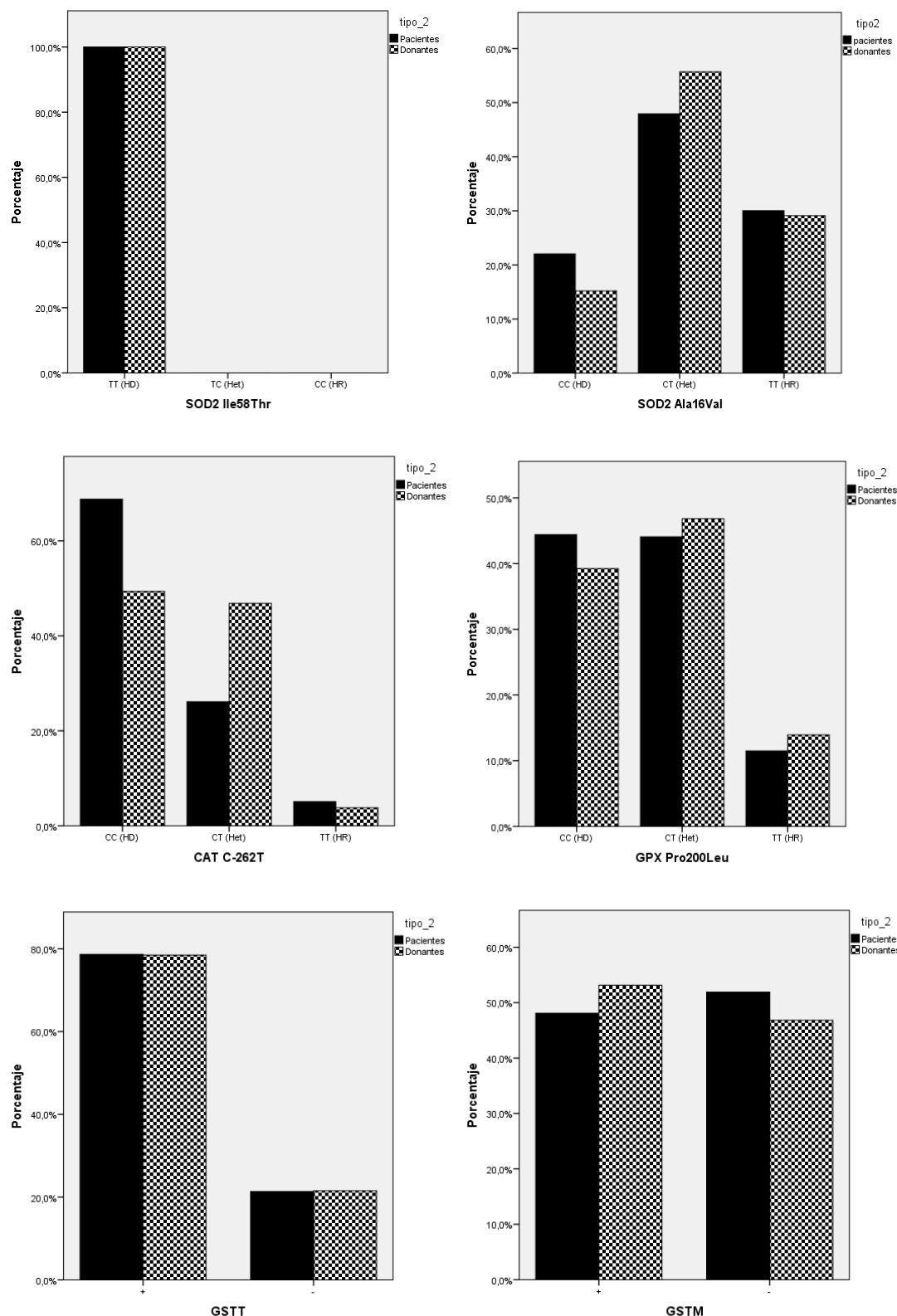


Figura 12: Gráficos de barras que muestran las frecuencias genotípicas para los SNPs SOD Ile58Thr, SOD2 Ala16Val, CAT C-262T y GPX Pro200Leu, y para dos variantes nulas de dos enzimas de la familia de la GST, GSTT1 y GSTM1, en las 2 cohortes estudiadas, pacientes infértiles y donantes fértiles.

Igualmente, al determinar la asociación de estos polimorfismos con la presencia de infertilidad mediante el cálculo de odds ratio se obtuvieron valores estadísticamente

significativos para el SNP CAT C-262T (ver **Figura 13**); en concreto, el genotipo homocigoto CC se asoció con la presencia de infertilidad (OR = 2.262; 95% CI = 1.369 - 3.733; $P = 0.001$) mientras que el heterocigoto CT se asoció con un efecto protector (OR = 0.401; 95% CI = 0.241 - 0.667; $P = 0.001$).

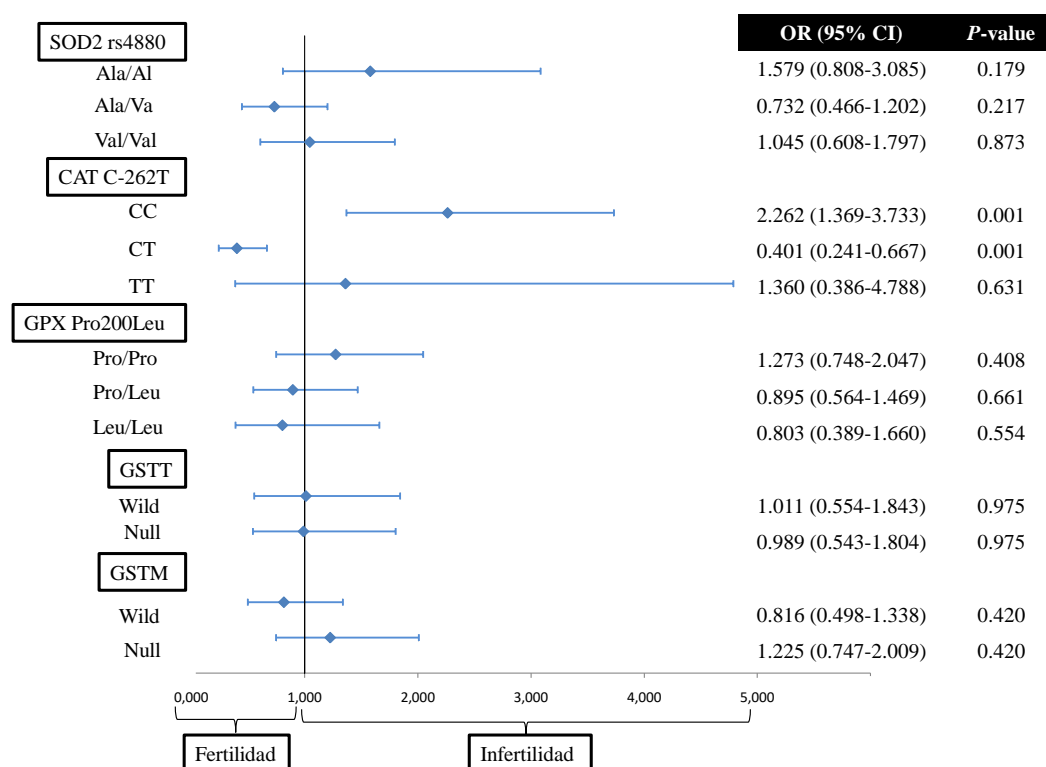


Figura 13: Forest plot que muestra los odds-ratio de infertilidad para los distintos genotipos de los SNPs SOD2 Ala16Val, CAT C-262T y GPX Pro200Leu y las variantes nulas de la enzimas GSTT y GSTM. Los rombos representan los OR mientras que las líneas horizontales representan los 95%CI. La línea vertical marca el valor nulo (OR=1). P-value calculado mediante el test Chi-cuadrado.

Cuando se compararon los valores medios de los distintos parámetros del seminograma tradicional entre los distintos genotipos de cada polimorfismo (ver **Tabla 27**) se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el SNP CAT C-262T con respecto a la motilidad ($H=6.12$, $P=0.047$) y a la morfología ($H=7.42$, $P=0.024$). Comparaciones subsiguientes pareja a pareja revelaron diferencias significativas para el parámetro morfología entre los genotipos CC y CT ($H=-32.18$, $P=0.029$, $r=-0.130$). Además, también se obtuvieron diferencias casi significativas para SNP CAT C-262T con respecto al parámetro concentración ($H=5.94$, $P=0.051$).

			Genotipos			p-value ₁	p-value ₂
SOD2 Ala16Val			Ala/Ala	Ala/Val	Val/Val		
	Volumen (mL)	Pacientes	3.25	3.43	3.21	0.749	0.781
		Donantes	3.08	3.27	3.08	0.722	
	Concentración (mil/mL)	Pacientes	26.19	26.83	27.47	0.983	0.736
		Donantes	51.50	54.56	53.60	0.984	
	Motilidad (%)	Pacientes	37.04	39.85	38.54	0.354	0.108
		Donantes	55.83	54.77	53.47	0.567	
	Morfología (%)	Pacientes	3.34	3.43	3.39	0.955	0.526
		Donantes	6.41	6.59	6.04	0.768	
	Fragmentación (%)	Pacientes	21.06	19.31	19.32	0.634	0.634
		Donantes					
	Estrés oxidativo (%)	Pacientes	42.00	43.30	45.10	0.957	0.793
		Donantes	41.60%	40.90	43.50	0.593	
CAT C-262T			CC	CT	TT		
	Volumen (mL)	Pacientes	3.37	3.16	3.53	0.504	0.820
		Donantes	3.07	3.36	2.60	0.487	
	Concentración (mil/mL)	Pacientes	26.26	27.51	33.02	0.419	0.051
		Donantes	52.93	53.94	64.00	0.294	
	Motilidad (%)	Pacientes	38.48	38.72	45.93	0.080	0.047
		Donantes	55.25	54.18	50.00	0.171	
	Morfología (%)	Pacientes	3.31	3.54	4.12	0.159	0.024
		Donantes	6.48	6.48	5.00	0.088	
	Fragmentación (%)	Pacientes	19.84	18.66	22.88	0.849	0.849
		Donantes					
	Estrés oxidativo (%)	Pacientes	44.20	41.40	43.70	0.415	0.885
		Donantes	43.60	40.90	33.30	0.854	
GPX1 Pro200Leu			Pro/Pro	Pro/Leu	Leu/Leu		
	Volumen (mL)	Pacientes	3.31	3.49	2.79	0.018	0.044
		Donantes	3.20	3.20	3.11	0.983	
	Concentración (mil/mL)	Pacientes	27.92	25.37	29.05	0.780	0.701
		Donantes	53.19	54.05	54.81	0.789	
	Motilidad (%)	Pacientes	38.64	38.88	39.44	0.830	0.783
		Donantes	55.64	54.05	53.18	0.642	
	Morfología (%)	Pacientes	3.41	3.31	3.75	0.597	0.618
		Donantes	6.25	6.59	6.18	0.866	
	Fragmentación (%)	Pacientes	20.88	19.06	17.64	0.509	0.509
		Donantes					
	Estrés oxidativo (%)	Pacientes	44.90	42.10	44.50	0.725	0.632
		Donantes	51.60	37.90	27.20	0.832	
GSTT1 null			Wild		Null		
	Volumen (mL)	Pacientes	3.33		3.33	0.651	0.889
		Donantes	3.25		2.95	0.508	
	Concentración (mil/mL)	Pacientes	27.50		24.85	0.569	0.604
		Donantes	53.46		58.76	0.620	

	Motilidad (%)	Pacientes	39.00		38.65	0.921	0.859
		Donantes	54.91		54.91	0.340	
	Morfología (%)	Pacientes	3.42		3.35	0.855	0.986
		Donantes	6.21		6.21	0.460	
	Fragmentación (%)	Pacientes	19.65		19.82	0.923	0.923
		Donantes					
	Estrés oxidativo (%)	Pacientes	41.10		52.20	0.096	0.051
		Donantes	40.30		47.10	0.388	
GSTM null			Wild		Null		
	Volumen (mL)	Pacientes	3.32		3.34	0.464	0.719
		Donantes	3.30		3.05	0.460	
	Concentración (mil/mL)	Pacientes	27.25		26.64	0.704	0.460
		Donantes	53.14		54.59	0.961	
	Motilidad (%)	Pacientes	39.93		38.00	0.365	0.266
		Donantes	53.81		55.40	0.152	
	Morfología (%)	Pacientes	3.46		3.36	0.455	0.256
		Donantes	6.54		6.24	0.556	
	Fragmentación (%)	Pacientes	19.33		20.03	0.819	0.819
		Donantes					
	Estrés oxidativo (%)	Pacientes	36.60		49.70	0.080	0.102
		Donantes	50.00		32.50	0.438	

Tabla 27: Comparación según genotipos de los valores medios obtenidos para cada parámetro en el seminograma clásico para los SNPs SOD2 Ala16Val, CAT C-262T y GPX Pro200Leu y las variantes nulas de las enzimas GSTT1 y GSTM1. P-value₁=comparación dentro de cada cohorte analizada. P-value₂: comparación para el conjunto de la población analizada (393 muestras). P-values obtenidos mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis para los parámetros volumen, concentración, motilidad, morfología y fragmentación. Los valores recogidos muestran las medias para todos los parámetros excepto para el parámetro estrés oxidativo que aparece reflejado como la frecuencia de casos con niveles altos de estrés oxidativo (N3+N4) y su P-value se calculó con el test Chi-cuadrado.

También se realizó una comparación directa de frecuencias genotípicas entre donantes, pacientes con diagnóstico normozoospermicos y pacientes con diagnóstico no normozoospermico obteniéndose nuevamente únicamente significación estadística para el SNP CAT C-262T.

También se realizaron análisis de asociación de los distintos genotipos con los niveles de estrés oxidativo. Los odds ratio de tener altos niveles de estrés oxidativo (N3 y N4) para cada genotipo aparecen reflejados en la **Figura 14**. Aunque no se obtuvieron valores estadísticamente significativos para ninguno de los genotipos sí que se obtuvieron valores interesantes para las variantes de las GSTs; para ambas variantes la presencia de delección aumenta en 1.5 veces el riesgo de presentar niveles altos de estrés oxidativo.

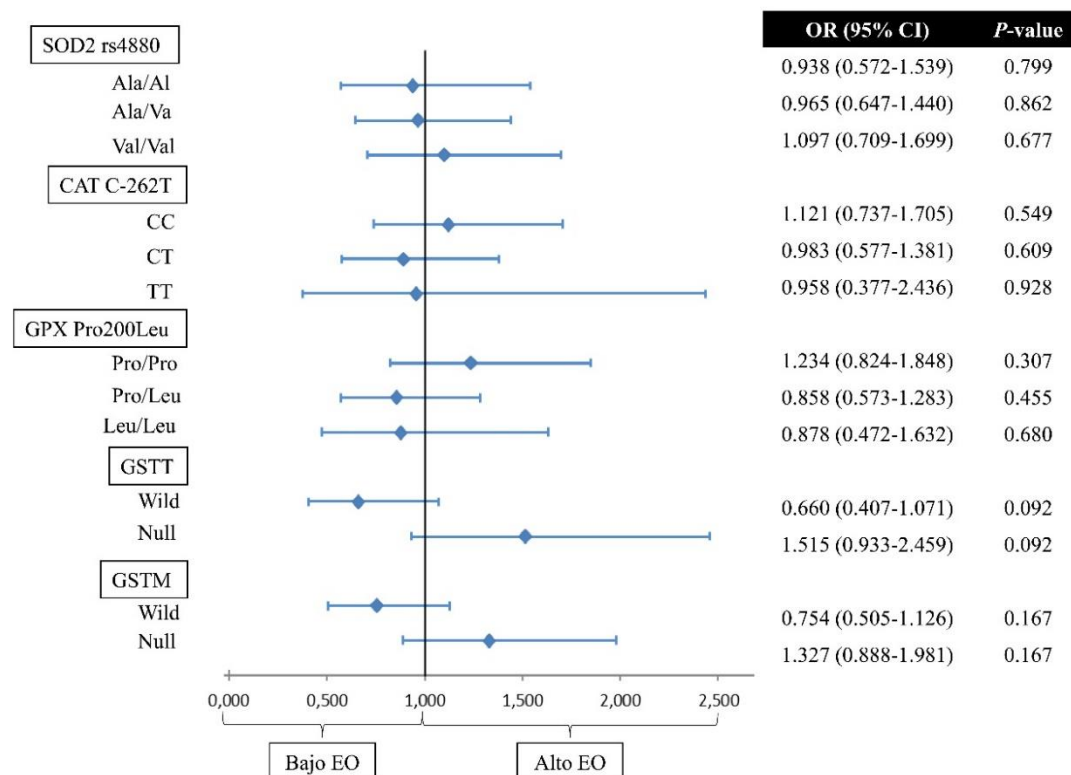


Figura 14: Forest plot que muestra los odds ratios de tener altos niveles de estrés oxidativo (N3 y N4) para cada genotipo estudiado para los SNPs SOD2 Ala16Val, CAT C-262T y GPX Pro200Leu y las variantes nulas de las enzimas GSTT1 y GSTM1. Los rombos representan los OR mientras que las líneas horizontales representan los 95%CI. La línea vertical marca el valor nulo (OR=1). P-value calculado mediante el test Chi-cuadrado.

2.3) Análisis funcional del polimorfismo CAT C-262T

De entre los 6 polimorfismos y 2 variantes nulas estudiados en esta tesis fue el SNP CAT C-262T el polimorfismo para el cual se obtuvieron los resultados más relevantes con respecto a su efecto sobre la fertilidad masculina. Como ya se ha indicado, al comparar las frecuencias genotípicas entre las 2 cohortes analizadas, pacientes infértiles y donantes de fertilidad probada, se encontraron diferencias significativas ($\chi^2(2) = 10.68$, $p = 0.002$), asociándose el genotipo homocigoto CC con la presencia de infertilidad (OR = 2.262; 95% CI = 1.369 - 3.733; $P = 0.001$) y el heterocigoto CT con un efecto protector (OR = 0.401; 95% CI = 0.241 - 0.667; $P = 0.001$) (ver **Figura 15** y **Figura 16**).

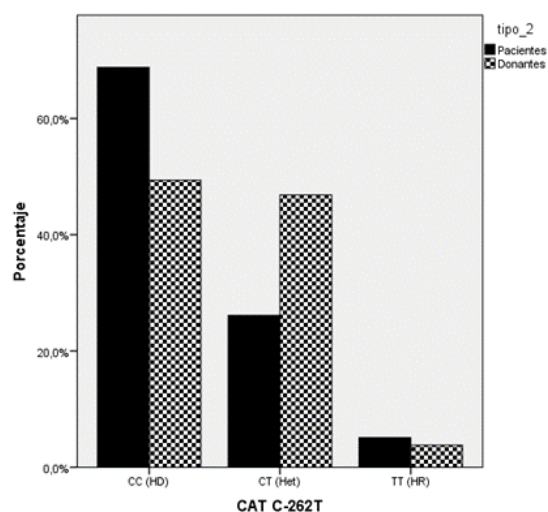


Figura 15: Gráfico de barras que muestra las frecuencias genotípicas para el SNP CAT C-262T en las 2 cohortes estudiadas, pacientes infértiles y donantes fértiles.

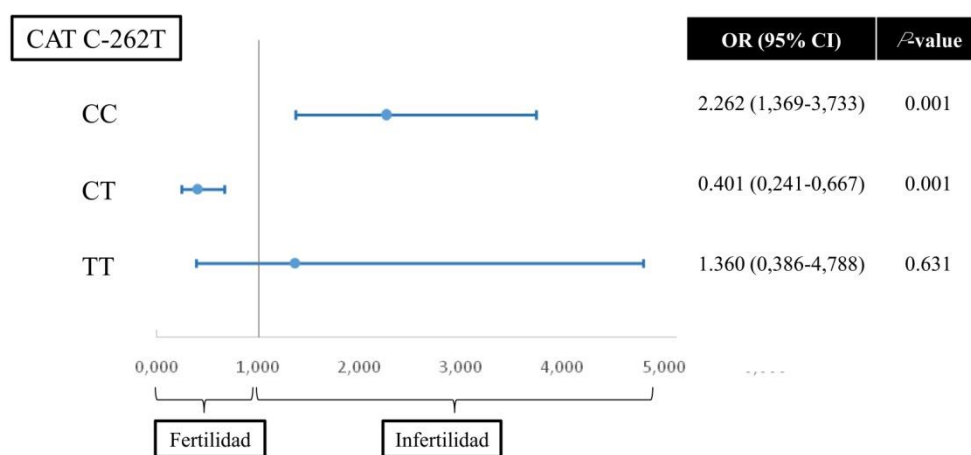


Figura 16: Forest plot que muestra los odds-ratio de infertilidad para los distintos genotipos del SNP CAT C-262T. Los rombos representan los OR mientras que las líneas horizontales representan los 95%CI. La línea vertical marca el valor nulo (OR=1). P-value calculado mediante el test Chi-cuadrado.

Cuando se compararon los valores medios de los distintos parámetros del seminograma tradicional entre los distintos genotipos del SNP CAT C-262T se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los parámetros motilidad ($H=6.12$, $P=0.047$) y morfología ($H=7.42$, $P=0.024$) y casi significativas para la concentración ($H=5.94$, $P=0.051$) (ver **Tabla 28**).

CAT C-262T	Genotipo			P-value
		CC	CT	TT
	Volumen (mL)	3.33	3.22	3.38
	Concentración (mil/mL)	30.35	35.73	37.91
	Motilidad (%)	41.05	43.52	46.57
	Morfología (%)	3.79	4.43	4.26
	Fragmentación (%)	19.84	18.66	22.88
	Estrés oxidativo (%)	42.00%	42.80%	44.80%

Tabla 28: Comparación según genotipos del SNP CAT C-262T de los valores medios obtenidos para cada parámetro en el seminograma clásico. P-values obtenidos mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis para los parámetros volumen, concentración, motilidad, morfología y fragmentación. Los valores recogidos muestran las medias para todos los parámetros excepto para el parámetro estrés oxidativo que aparece reflejado como la frecuencia de casos con niveles altos de estrés oxidativo (N3+N4) y su P-value se calculó con el test Chi-cuadrado.

Ante estos resultados y teniendo en cuenta que el polimorfismo analizado se localiza en el promotor del gen se realizaron varios estudios funcionales para determinar el efecto teórico y real que dicho polimorfismo tiene sobre la expresión del gen. Primeramente, se realizó una predicción *in silico* de la unión de factores de transcripción a cada variante alélica empleando para ello el programa TFBind. En segundo lugar, se estudió el efecto de las distintas variantes del polimorfismo a nivel del plasma seminal realizándose tanto análisis de actividad catalasa como de cantidad de enzimas. Por último, se analizó el efecto del polimorfismo sobre los niveles de expresión del RNA de la enzima catalasa en el propio espermatozoide.

2.3.a) Análisis *in-silico* del promotor de la catalasa en la zona del SNP CAT C-262T

En primer lugar, se realizó una predicción *in-silico* de la unión de factores de transcripción a cada variante alélica empleando para ello el programa TFBind. Como se puede observar en la **Tabla 29** se localizaron 5 factores transcripcionales comunes a ambos alelos, 7 específicos del alelo C y 8 específicos del alelo T. Además, mientras que de los 7 factores de transcripción específicos del alelo C, 2 son activadores y 2 represores, los 8 factores específicos del alelo T son todos factores activadores. Es importante destacar que entre los factores de transcripción específicos del alelo T se incluye el factor NRF2 el cual es un factor que participa en la respuesta a estrés oxidativo.

		Alelo	
		C	T
Factores de transcripción comunes a ambos alelos		IRF2 E2F TAXCREB AP2 IK3	IRF2 E2F TAXCREB AP2 IK3
Factores de transcripción exclusivos de un alelo	Activadores	LMO2 LYF1	IRF1 NFKAPPAB CREL HSF1 STAT1 NRF2 AHR STAT
	Represores	IK1 IK2	
	Activadores/represores	GATA1 GATA2 GATA3	

Tabla 29: Predicción *in silico* de la unión de factores de transcripción en la región del promotor del gen de la catalasa en la que se localiza el SNP CAT C-262T.

2.3.b) Análisis de la actividad catalasa en plasma seminal (gel y western blot)

En segundo lugar, se seleccionaron al azar dentro del subgrupo de validación de la cohorte de pacientes 36 muestras, 12 muestras de cada genotipo, y se realizaron análisis de cantidad de proteína (western blot) y actividad catalasa (geles de actividad) en función del genotipo. Este último procedimiento, el uso de geles de actividad para medir los niveles de actividad catalasa, se puso a punto para muestras de plasma seminal por considerarlo más exacto que el uso de kits comerciales que miden la actividad catalasa en base a los niveles de peróxido de hidrógeno, los cuales dependen no solo de la enzima catalasa sino también de la actividad de otra serie de enzimas.

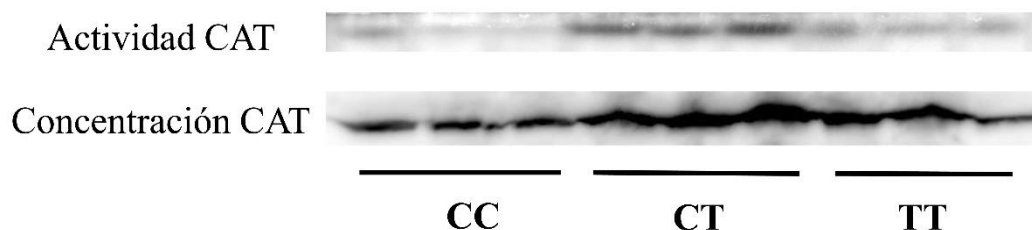


Figura 17: Estudio de expresión de la enzima catalasa. La línea superior muestra la actividad catalasa en gel y la inferior la cantidad de proteína mediante western blot. En ambos casos se observa como el genotipo heterocigoto CT para el SNP C-262T muestra los valores más elevados y el homocigoto CC los más bajos.

A simple vista puede observarse que existe una correlación entre ambas medidas. Además, como se puede apreciar en la **Figura 17** el genotipo heterocigoto CT mostró los valores más elevados tanto de actividad como de cantidad de enzima catalasa mientras que el homocigoto CC mostró los valores más bajos.

Las observaciones realizadas visualmente se confirmaron numéricamente para las 36 muestras analizadas empleando los valores de intensidad de las distintas bandas. Por una parte, se obtuvo una correlación estadísticamente significativa entre la cantidad de proteína y los niveles de actividad (Rho de Spearman=0.354, P=0.034) (ver **Figura 18**).

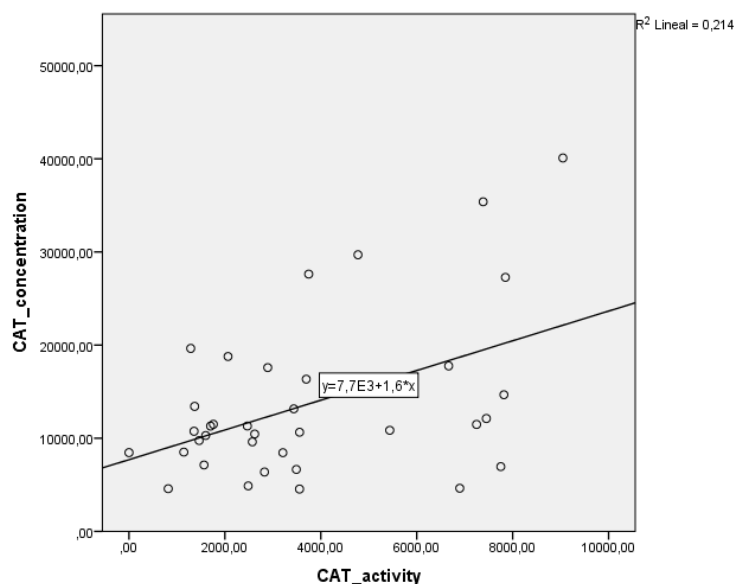


Figura 18: Correlación entre actividad catalasa y cantidad de enzima catalasa.

Por otra parte, al comparar los valores medios para cada genotipo se obtuvieron los valores más altos para el genotipo heterocigoto CT en ambos parámetros y los más bajos para el homocigoto CC (ver **Tabla 30** y **Figura 19**) ; estas diferencias fueron estadísticamente significativas para el parámetro actividad catalasa (H=11.761, P=0.003) y comparaciones subsiguientes pareja a pareja mostraron diferencias significativas entre los genotipos CC y CT (H=-14.75, P=0.002, r=-0.808). Además, estos resultados indican que la variante CT presenta unos niveles de actividad aproximadamente 3 veces superiores a la variante CC.

Genotipo	Actividad catalasa	Cantidad de enzima
Homocigoto CC	2168 ± 1707	11983 ± 5315
Heterocigoto CT	5875 ± 2755	16284 ± 11485
Homocigoto TT	3204 ± 1205	12787 ± 8090
P-value	0.003	0.660

Tabla 30: Valores medios de actividad catalasa y cantidad de enzima para cada genotipo del SNP C-262T. P-values obtenidos mediante el Test Kruskal-Wallis.

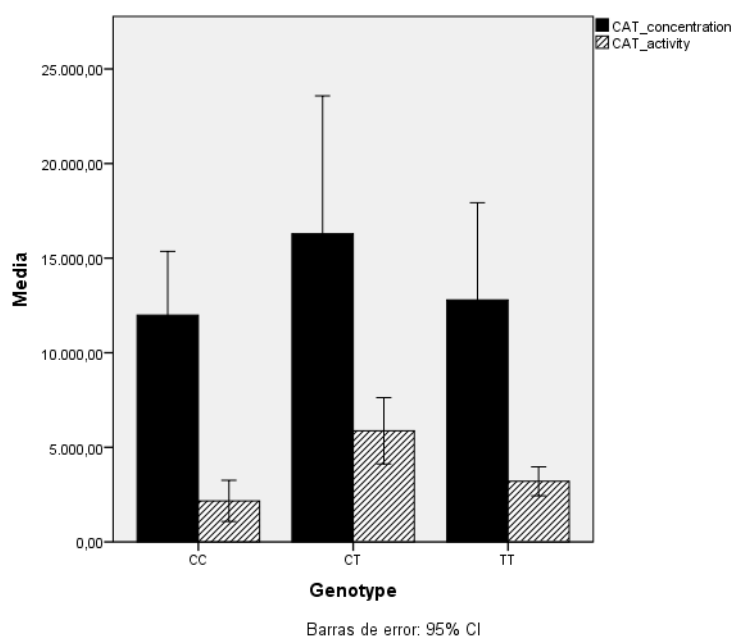


Figura 19: Valores medios de actividad catalasa y cantidad de enzima para cada genotipo del SNP CAT C-262T.

Además, se observó una correlación negativa estadísticamente significativa entre los niveles de actividad catalasa en el plasma seminal y los niveles de estrés oxidativo (U-Mann Whitney= 94, $P=0.042$): aquellas muestras que presentaron niveles de estrés oxidativo bajos (N1 o N2) presentaron también mayor actividad catalasa que las muestras con niveles de estrés oxidativo alto (N3 o N4). Una correlación similar se observó también para la concentración de la enzima catalasa aunque en este caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas (ver **Figura 20**). Estas observaciones correlacionaron también con la presencia de menor índice de fragmentación del DNA en el grupo de muestras con menor estrés oxidativo y mayor actividad catalasa (ver **Tabla 31**).

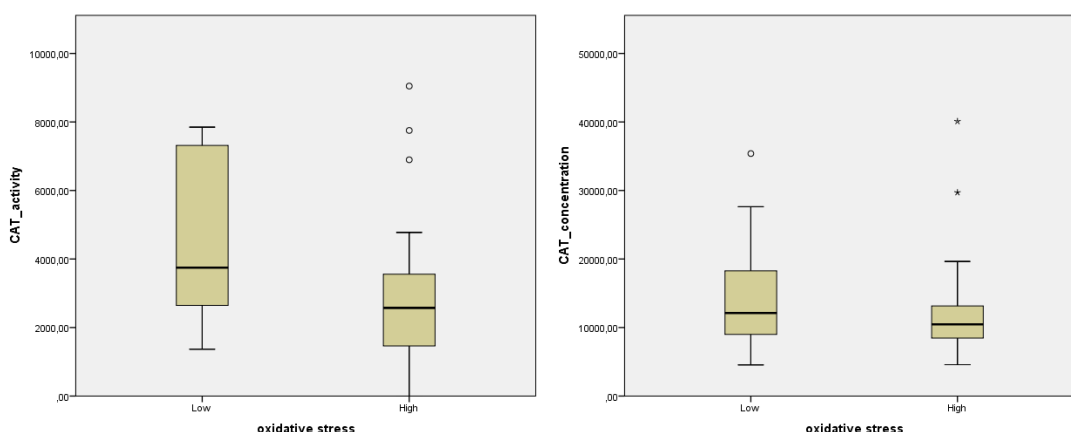


Figura 20: Gráficos de cajas y bigotes que muestran los valores de actividad catalasa (izquierda) y concentración de enzima catalasa (derecha) en función del nivel de estrés oxidativo seminal. Low=N1+N2. High=N3+N4.

Estres oxidativo	Actividad catalasa	Cantidad de enzima	Fragmentación del DNA (%)
Bajo (N1 + N2)	4728 ± 2468	15025 ± 8932	15.73 ± 9.20
Alto (N3 + N4)	3050 ± 2339	12727 ± 8497	18.27 ± 9.53
P-value	0.042	0.279	0.456

Tabla 31: Valores medios de actividad catalasa, cantidad de enzima e índice de fragmentación del DNA en función de los niveles de estrés oxidativo seminal. P-values obtenidos mediante el Test U Man Whitney.

2.3.c) Análisis de expresión de la enzima catalasa (mRNA) en el espermatozoide

Por otra parte, se estudió la expresión del RNA mensajero de la enzima catalasa en el espermatozoide y lo primero que se observó es que este aparece en muy baja concentración, siendo detectable mediante el método empleado únicamente en aquellas muestras en las que la cantidad de RNA aislada es más alta. En concreto, de las 90 muestras incluidas en este apartado, 66 amplificaron para la protamina 2 mientras que únicamente 37 amplificaron para la catalasa. Al ser la frecuencia del genotipo TT tan baja, de estas 37 muestras únicamente 1 resultó ser un TT, motivo por el cual se decidió realizar el estudio de expresión comparando entre los dos genotipos restantes que son por otra parte los que, de acuerdo con los resultados obtenidos a nivel genético y a nivel proteico, presentan los niveles de expresión más dispares, el homocigoto CC y el heterocigoto CT.

Al comparar mediante PCR semicuantitativa los niveles de expresión entre los genotipos homocigoto CC y el heterocigoto CT, se observó visualmente que el heterocigoto CT parece tener unos niveles de expresión ligeramente más elevados (ver **Figura 21**). Esta observación se confirmó objetivamente mediante un estudio de imagen, normalizando la intensidad de los productos de PCR de la catalasa con los de la protamina 2, y obteniéndose que el genotipo heterocigoto muestra unos niveles de expresión superiores al genotipo homocigoto CC si bien las diferencias no son estadísticamente significativas (0.248 vs 0.171 respectivamente, $P=0.627$).

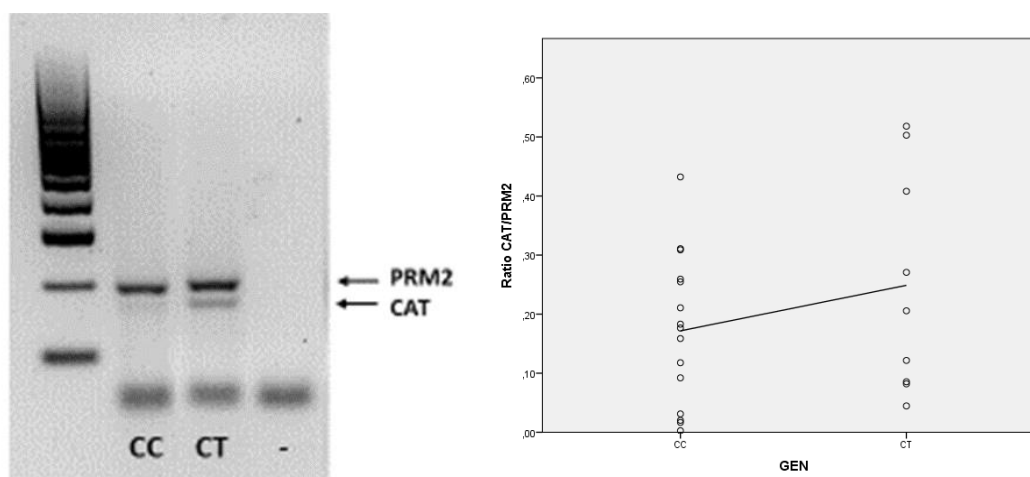


Figura 21: Análisis de expresión de la enzima catalasa en función del SNP CAT C-262T. Izqda: PCR semicuantitativa.. Dcha: Niveles de expresión para los distintos genotipos. Carriles: Marcador de tamaños de 100pb, CC=genotipo CC, CT= genotipo CT, -= control negativo. Tamaños de banda: PRM2 = 192 pb y CAT = 165 pb.

Resultados similares se obtuvieron mediante real time PCR, obteniéndose unos valores de ΔCt de 6.87 para el grupo CC y 5.05 para el grupo CT. Considerando el grupo CT como experimental y el CC como control se obtiene un $\Delta\Delta Ct$ de -1.82 lo cual implica que el grupo CT tiene unos niveles de expresión ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 3.5 veces superiores al CC, valor muy similar al obtenido en el estudio de actividad catalasa mediante geles de actividad.

3) Estudio de los prostasomas como fuente de marcadores de infertilidad

En el segundo bloque de la tesis se realizó un estudio de los prostasomas presentes en el plasma seminal, incluyendo tanto análisis morfológicos como estudios del contenido proteico y de DNA de los mismos, y comparando entre prostasomas aislados de eyaculados normozoospermicos y prostasomas aislados de eyaculados no normozoospermicos.

3.1) Descripción morfológica de los prostasomas

Tal y como se ha indicado en la sección de material y métodos, se llevó a cabo el aislamiento de los prostasomas seminales de 50 muestras de semen, resuspendiéndose todos los pellets en 1ml de PBS. La **Tabla 32** muestra las medias obtenidas para los distintos parámetros utilizados en la caracterización de los pellets de prostasomas: partículas/mL, μg proteína/mL, diámetro mínimo, diámetro medio, diámetro máximo y diferencias entre diámetros.

Parámetro	Media \pm SD
Partículas/mL	$3.45 \times 10^{12} \pm 2.68 \times 10^{12}$
μg proteína/mL	4500 ± 2492
Diámetro mínimo (nm)	93.00 ± 19.78
Diámetro medio (nm)	145.16 ± 27.00
Diámetro máximo (nm)	207.07 ± 36.04
Dmax - Dmin (nm)	114.07 ± 24.59

Tabla 32: Medias obtenidas para los distintos parámetros utilizados para caracterizar los pellets de prostasomas.

Cuando se compararon estos mismos parámetros morfológicos entre prostasomas aislados de plasma seminal de muestras normozoospermicas y de muestras no normozoospermicas (ver **Tabla 33**) se observó que las primeras tienen valores ligeramente inferiores tanto para la concentración de partículas como para el diámetro medio ($2.47 \times 10^{12}/mL$ vs $4.02 \times 10^{12}/mL$ y $143nm$ vs $148nm$ respectivamente); no obstante, dichas diferencias no son estadísticamente significativas.

Parámetro	Normozoospermicas	No normozoospermicas	P-Value
Partículas/mL	2.47E+12 ± 1.17E+12	4.02E+12 ± 3.22E+12	0.667
µg proteína/mL	4119 ± 2085	4827 ± 2831	0.631
Diámetro mínimo (nm)	93 ± 15	91 ± 23	0.899
Diámetro medio (nm)	143 ± 22	148 ± 31	0.432
Diámetro máximo (nm)	202 ± 20	214 ± 45	0.212
Dmax - Dmin (nm)	109 ± 13	123 ± 29	0.193

Tabla 33: Comparación entre prostasomas obtenidos de muestras normozoospermicas y no normozoospermicas para los distintos parámetros utilizados para caracterizar los pellets de prostasomas. P-values obtenidos mediante el Test U Man Whitney.

El estudio de los aislados de prostasomas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostró un patrón morfológico similar en las 4 muestras seleccionadas, con la presencia de dos subpoblaciones de prostasomas: una subpoblación de mayor tamaño y electrodensa y otra subpoblación de menor tamaño y electrosuave (ver **Figura 22**). Por el contrario, en los aislados de prostasomas provenientes de muestras normozoospermicas se observó una mayor presencia de partículas lipídicas y cuerpos multivesiculares que en los aislados provenientes de muestras no normozoospermicas.

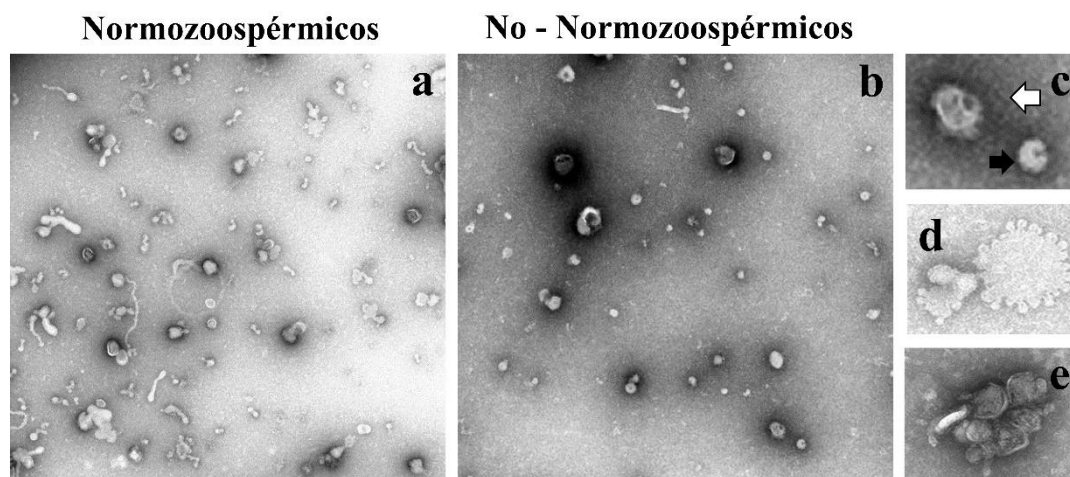


Figura 22: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de dos pellets de prostasomas. Tanto en el pellet aislado de muestra normozoospermica (a) como en el aislado de muestra no normozoospermica (b) se observa la presencia de dos subpoblaciones de prostasomas (c): una de mayor tamaño y electrodensa (flecha blanca) y otra de menor tamaño y electrosuave (flecha negra). Además, el pellet aislado de muestra normozoospermica muestra una mayor presencia de partículas lipídicas (d) y cuerpos multivesiculares (e).

3.2) Estudio descriptivo de la carga proteica de los prostasomas

Se determinó el número total de proteínas prostasómicas detectadas mediante técnicas de espectrometría de masas. Dichas proteínas se clasificaron en base a los criterios Gene

Ontology, prestando especial atención a aquellas proteínas relacionadas con los procesos reproductivos y el estrés oxidativo.

Cuando se realizaron las carreras de los 7 pooles (26 muestras, 12 normozoospermicas agrupadas en 3 pooles y 14 no normozoospermicas agrupadas en 4 pooles) por separado se detectó un total de 1282 proteínas diferentes (multiconsensus). La cantidad de proteínas detectadas en cada pool osciló entre 865 y 1004, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en función de la calidad del eyaculado (ver **Tabla 34**).

Pool	Nº de proteínas detectadas	Media	P-value
Normozoospermicos	899	923	1.000
	892		
	978		
No normozoospermicos	865	934	
	1004		
	917		
	950		

Tabla 34: Cantidad de proteínas detectadas en cada pool de prostasomas. P-value obtenido mediante el Test U Man Whitney.

Con el sistema iTRAQ fraccionado se detectaron 796 proteínas comunes a todos los pooles (62% del total de proteínas detectadas). Dentro de estas proteínas se encuentran 4 proteínas que han sido definidas en la literatura científica como marcadores específicos de prostasomas: fosfatasa ácida prostática (PAP), antígeno específico prostático (PSA), serine proteasa transmembrana tipo 2 (TMPRSS2) y aminopeptidasa (CD13). Además, no se detectó en ninguno de los pooles la presencia de la proteína calnexina lo cual indica que los asilados de prostasomas están libres de contaminación por restos celulares.

Estas proteínas comunes a todos los pooles se clasificaron en base a su función y localización biológica mediante el uso de sus correspondientes anotaciones Gene Ontology (ver **Figura 23**):

- Función molecular: más de la mitad de las proteínas detectadas (52.1%) corresponden a proteínas con actividad catalítica mientras que un cuarto (28.7%) son proteínas de unión.
- Proceso biológico: aproximadamente un cuarto de las proteínas detectadas son proteínas que participan en procesos celulares y otro cuarto son proteínas que participan en procesos metabólicos. Destacar que menos de un 1% de las proteínas detectadas son proteínas que participan específicamente en procesos de reproducción.
- Componente celular: el 43% de las proteínas detectadas son proteínas estructurales, un 25% forman parte de orgánulos y un 12% son proteínas de membrana. Menos de un 10% de las proteínas detectadas son proteínas con localización extracelular.

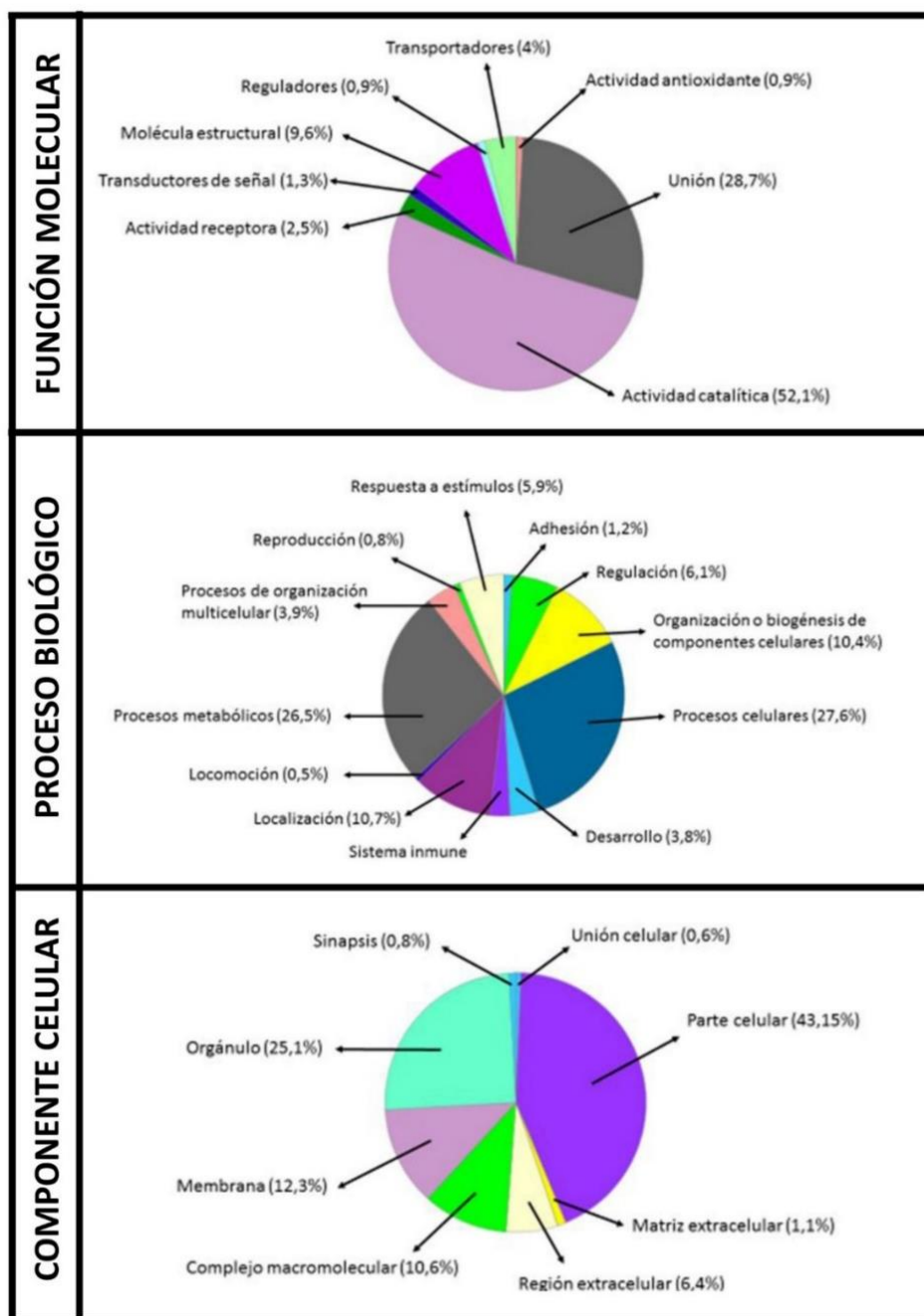


Figura 23: Gráficos que muestran los porcentajes correspondientes a las distintas categorías de anotación Gene Ontology para las 796 proteínas comunes a todos los pools de prostasomas.

De entre todas las proteínas detectadas en todos los pools centramos nuestra atención en dos grupos de proteínas: las proteínas con actividad relacionada con el proceso reproductivo y las proteínas con actividad antioxidante. De acuerdo con las anotaciones Gene Ontology se detectaron 9 proteínas con implicación en los procesos reproductivos y 6 con actividad antioxidante (ver **Tabla 35**).

Accesion number	Gen	Proteína
Proteínas con implicación en los procesos reproductivos		
Q9Y5X9	LIPG	Endothelial lipase
Q53H76	PLA1A	Phospholipase A1
P06858	LPL	Lipoprotein lipase
Q6XZB0	LIPI	Lipase member 1
P07602	PSAP	Prosaposin
Q9H4G4	GLIPR2	Golgi associated plant pathogenesis-related protein 1
Q14204	DYNC1H1	Citoplasmic dynein 1
Q9Y6R7	FCGBP	IGgFc binding protein
Q6W4X9	MUC6	Mucin 6
Proteínas con actividad antioxidante		
P05164	MPO	Myeloperoxidase
Q06830	PRDX1	Peroxiredoxin 1
P32119	PRDX2	Peroxiredoxin 2
P13162	PRDX3	Peroxiredoxin 3
P30041	PRDX6	Peroxiredoxin 6
P00441	SOD	Superoxide dismutase

Tabla 35: Registro de proteínas detectadas en todos los aislados de prostasomas cuyas anotaciones Gene Ontology corresponden con las categorías “proteínas con implicación en los procesos de reproducción” y “proteínas con actividad antioxidante”.

Proteínas implicadas en los procesos reproductivos

- Lipasa endotelial (Q9Y5X9)

Codificada en el cromosoma 18q21.1 y de 56.9KDa de tamaño, presenta actividades fosfolipasa y trigliceridolipasa y es la enzima que hidroliza lipoproteínas de alta densidad (HDL) con mayor efectividad. Su presencia se ha detectado en numerosos órganos, incluyendo hígado, riñón, pulmón, tiroides, etc, siendo corazón, cerebro y músculo los principales órganos en los que no se ha detectado.

Respecto a su implicación en procesos reproductivos, se ha detectado una elevada expresión de la lipasa endotelial en próstata, testículo, cuerpo lúteo y placenta. A nivel testicular, la lipasa endotelial y la lipoproteín lipasa participan en el suplemento de nutrientes en el testículo, así como en la esteroidogénesis, siendo la lipasa endotelial especialmente importante para el aporte del colesterol necesario para la producción de testosterona en las células de Leydig.

- Fosfolipasa A1 (Q53H76)

Codificada en el cromosoma 3q13.33, es una fosfolipasa de 49.7 KDa que hidroliza los enlaces ester en posición sn-1 de glicerofosfolípidos. Su presencia se ha detectado en linfocitos y en próstata.

- Lipase member 1 (Q6XZB0)
Codificada en el cromosoma 21q11.2, es una fosfolipasa de 52.9KDa que hidroliza específicamente el ácido fosfatídico para producir ácido lisofosfatídico, un potente lípido bioactivo. Su expresión se localiza mayoritariamente de adipocitos y próstata. Defectos en su funcionamiento se relacionan directamente con la aparición de hipertriglicemia familiar.
- Lipoprotein lipasa (P06858)
Codificada en el cromosoma 8p19.1, es una proteína de 50.4KDa con dos funciones: hidrolasa de triglicéridos y ligando para la internalización de lipoproteínas mediada por receptor. Su presencia se detecta principalmente en suero sanguíneo y tejido adiposo.
A nivel reproductivo, se ha detectado en placenta, próstata y testículo, donde como ya se ha mencionado participa junto con la lipasa endotelial en el suplemento de nutrientes.
- Prosaposina (P07602)
Codificada en el cromosoma 10q22.1, se trata de una preproteína de 524 aminoácidos que es proteolizada para dar lugar a 4 productos de aproximadamente 60 aminoácidos cada uno, las saposinas A, B, C y D. Mientras que la prosaposina puede aparecer tanto como proteína secretada como localizada en la membrana, las saposinas aparecen principalmente en los compartimentos lisosomales donde participan en el metabolismo de glicoesfingolípidos con oligosacáridos de cadena corta. Esta proteína presenta altos niveles de expresión en diversos órganos, especialmente en sangre y retina, incluyendo todos los órganos reproductivos (ovario, útero, próstata y testículo).
- Golgi associated plant pathogenesis-related protein 1 (Q9H4G4)
Codificada en el cromosoma 9p13.3, es una proteína de 17.2KDa con actividad de unión de homodímeros que se une a las membranas del aparato de Golgi en microdominios ricos en lípidos. Aparece en gran cantidad en casi todos los órganos, incluyendo próstata, testículo y vesículas seminales.
- Dineina citoplásmica 1 (Q14201)
Codificada en el cromosoma 14q32.31, es un homodímero de 53.2KDa con actividad ATPasa que actúa como motor molecular para el transporte retrogrado de vesículas y orgánulos a lo largo de los microtúbulos. Se han detectado altas concentraciones en próstata y testículo.

- IGgFc binding protein (Q9Y6R7)
Codificada en el cromosoma 19q13.2, es una proteína de 502KDa involucrada en el mantenimiento de la estructura gel de la mucosa. Se expresa principalmente en placenta, colon y tiroides pero también se ha detectado expresión en testículo y próstata
- Mucina 6 (Q6W4X9)
Las mucinas son una familia de glicoproteínas de alto peso molecular producidas por diversos tejidos epiteliales. La mucina 6, codificada en el cromosoma 11p15.5, es una proteína de 25.7KDa expresada y liberada fundamentalmente en el estómago donde forma parte de la barrera protectora mucosa. También se ha detectado en gran cantidad en las secreciones del páncreas y las vesículas seminales, así como en el moco cervical.

Proteínas con actividad antioxidante

- Peroxirredoxins
Las peroxirredoxinas son una familia de enzimas antioxidantes que reducen el peróxido de hidrógeno a alquil hidroperóxidos. Varios estudios han concluido que las peroxirredoxinas suponen una primera defensa frente a concentraciones de peróxido de hidrógeno ligeramente superiores a las fisiológicas mientras que la catalasa actuaría frente a concentraciones más elevadas del mismo.
- Myeloperoxidasa (P05164)
Enzima que elimina el peróxido de hidrógeno combinándolo con cloro para liberar ácido hipocloroso.
- Superoxido dismutasa (P00441)
Enzima antioxidante mitocondrial codificada en el cromosoma 6q25. Cataliza la detoxificación de los radicales superóxido en la mitocondria produciendo H_2O_2 como subproducto.

3.3) Estudio comparativo de la carga proteica de los prostasomas

3.3.a) Estudio proteico comparativo cualitativo

Al comparar a nivel cualitativo el contenido proteico de los prostasomas aislados a partir de muestras seminales normozoospermicas con el de los prostasomas aislados a partir de muestras no normozoospermicas se encontraron 2 proteínas presentes en todos los pools de muestras normozoospermicas y ausentes de los de muestras no normozoospermicas y 3 proteínas presentes en todos los pools de muestras no normozoospermicas y ausentes de los de muestras normozoospermicas (ver **Tabla 36**).

No obstante, ninguna de las 5 proteínas parece candidata a tener una implicación relevante en la situación de fertilidad del varón.

Accession number	Gen	Proteína
Proteínas que aparecen en todas los aislados de prostasomas de muestras normozoospermicas pero en ninguno de los aislados de muestras no normozoospermicas		
Q9UL26	RB22A	Ras-related protein Rab-22A
P62333	PSMC6	26S protease regulatory subunit 10B
Proteínas que aparecen en todas los aislados de prostasomas de muestras no normozoospermicas pero en ninguno de los aislados de muestras normozoospermicas		
C9J0A7	CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2b
O14980	XPO1	Exportin-1
P39019	RPS19	40S ribosomal protein S19

Tabla 36: Selección de proteínas prostasómicas que aparecen en todos los aislados de un grupo y en ninguno del otro grupo.

Por otra parte, al clasificar las proteínas detectadas en ambos grupos de prostasomas en base a sus categorías Gene Ontology “función molecular” y “proceso biológico” se obtuvieron porcentajes similares en ambos grupos para todas las categorías (ver **Figura 24**). Cabe destacar que, al realizar una comparación que muestra específicamente las categorías en las que la variación de porcentaje es mayor, en el caso de los prostasomas aislados a partir de muestras normozoospermicas se observó un ligero incremento en el porcentaje de proteínas incluidas en los procesos biológicos “motilidad” y “adhesión celular” (ver **Figura 25**), procesos ambos directamente relacionados con la reproducción.

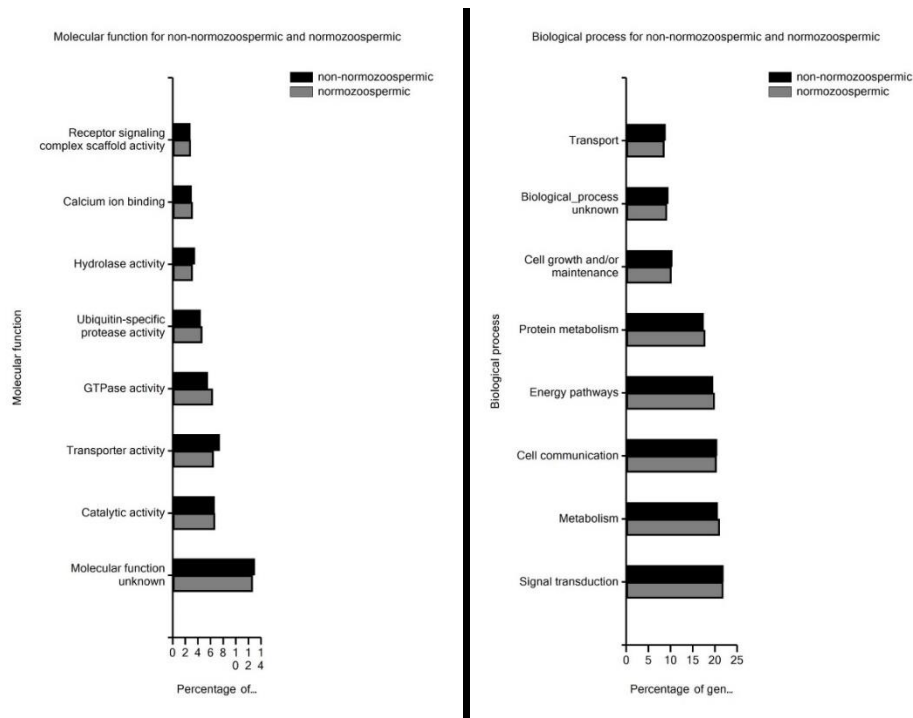


Figura 24: Comparación del contenido proteico de los prostasomas aislados de muestras seminales normozoospermicas con el de prostasomas aislados de muestras seminales no normozoospermicas en términos del porcentaje de proteínas incluidas en las categorías Gene Ontology “función molecular” y “proceso biológico”.

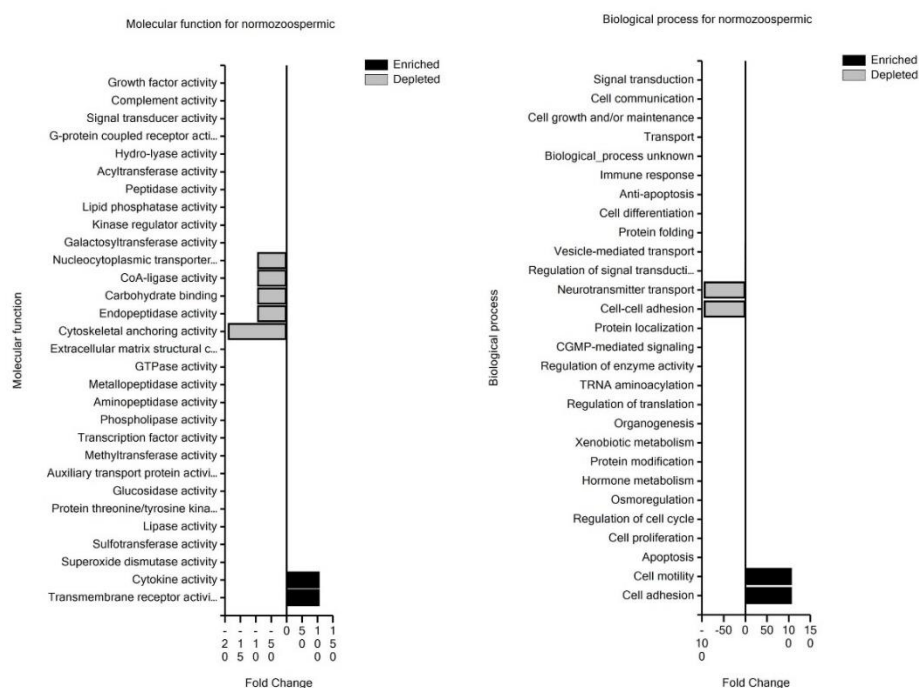


Figura 25: Comparación del contenido proteico de los prostasomas aislados de muestras seminales normozoospermicas con el de prostasomas aislados de muestras seminales no normozoospermicas en la que se muestran aquellas categorías Gene Ontology para las que existe una mayor variación de porcentaje entre ambos tipos de prostasomas.

3.3.b) Estudio proteico comparativo cuantitativo

El siguiente paso realizado fue comparar los niveles de expresión de aquellas proteínas que aparecen en todos los aislados de prostasomas analizados con el fin de detectar variaciones de expresión importantes en función de si dichos prostasomas provienen de muestras normozoospermicas o no normozoospermicas.

Tal y como se observa en el heat-map (**Figura 26**), se detectaron 123 proteínas con expresión diferencial en prostasomas aislados desde muestras normozoospermicas y no normozoospermicas, las cuales quedan reducidas a 61 cuando se eliminan las isoformas de la lista. De entre estas proteínas la mayoría, 54, aparecen subexpresadas en las muestras no normozoospermicas mientras que las restantes 7 aparecen sobreexpresadas en muestras no normozoospermicas. La **Tabla 37** muestra aquellas proteínas cuya variación en los niveles de expresión consideramos estadísticamente significativa (ratio mayor que 1.2 o menor que 0.8).

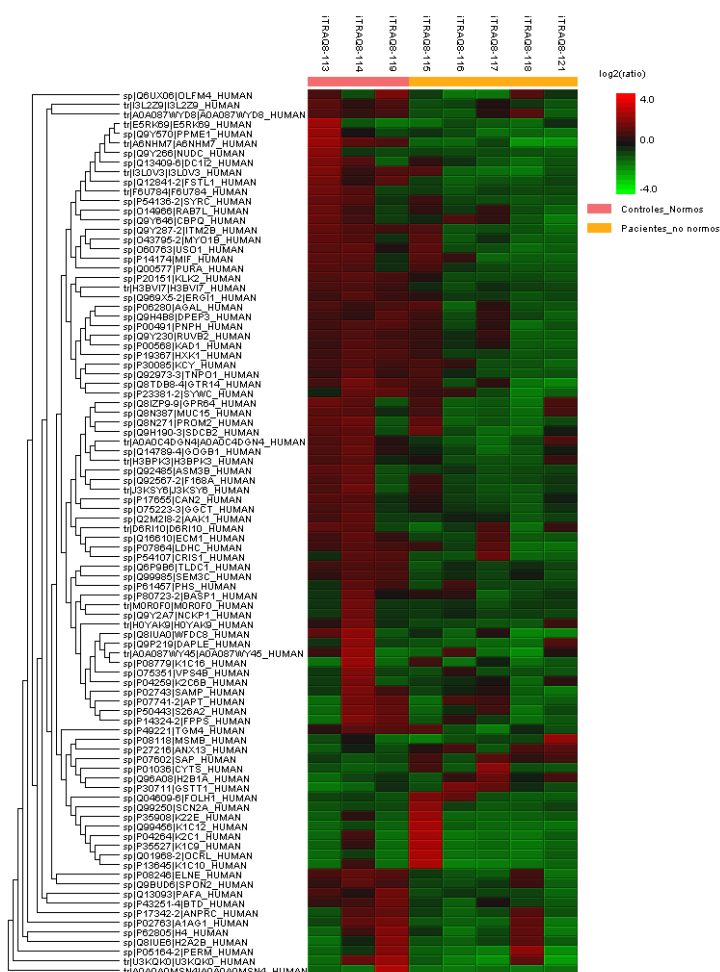


Figura 26: Heat-map que muestra los patrones de expresión proteica para aquellas proteínas con diferencias de expresión entre prostasomas de muestras normozoospermicas y no normozoospermicas. Se observa un claro patrón de subexpresión proteica en muestras no normozoospermicas.

Accession number	GN	Proteína	Fold change
Proteínas sobreexpresadas en prostasomas de muestras no normozoospermicas			
P30711	GSTT	Glutathione S-transferase theta-1	1,47
P01036	CST4	Cystatin-S	1,38
Q96A08	HIST1H2B	Histone H2B type 1-A	1,28
P08118	MSMB	Beta-microseminoprotein	1,28
Q04609	FOLH1	Glutamate carboxypeptidase 2	1,22
P07602	PSAP	Prosaposin	1,22
P27216	ANXA13	Annexin A13	1,22
Proteínas subexpresadas en prostasomas de muestras no normozoospermicas			
P07864	LDHC	L-lactate dehydrogenase C chain	0,8
P54107	CRISP1	Cysteine-rich secretory protein 1	0,8
Q9BUD6	SPON2	Spondin-2	0,79
Q16610	ECM1	Extracellular matrix protein 1	0,79
Q6P9B6	TLDC1	TLD domain-containing protein 1	0,79
P05164	MPO	Myeloperoxidase	0,78
P19367	HK1	Hexokinase-1	0,78
Q8N367	MUC15	Mucin-15	0,78
P49221	TGM4	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4	0,77
Q92485	SMPDL3B	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b	0,77
P00491	PNP	Purine nucleoside phosphorylase	0,77
P14174	MIF	Macrophage migration inhibitory factor	0,77
Q8IZP9	GRP64	G-protein coupled receptor 64	0,77
Q96DA0	ZG16B	Zymogen granule protein 16 homolog B	0,76
P20151	KLK2	Kallikrein-2	0,75
Q8N271	PROM2	Prominin-2	0,75
P07741	APRT	Adenine phosphoribosyltransferase	0,74
P10114	RAP2A	Ras-related protein Rap-2a	0,74
Q14789	GOLGB1	Golgin subfamily B member 1	0,74
O70763	USO1	General vesicular transport factor p115	0,74
O75351	VPS4B	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	0,73
Q6UX06	OLFM4	Olfactomedin-4	0,72
P62805	HIST1H4A	Histone H4	0,72
Q13093	PLA2G7	Platelet-activating factor acetylhydrolase	0,71
P50443	SLC26A2	Sulfate transporter	0,71
Q13409	DYNC1I2	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	0,7
P02743	APCS	Serum amyloid P-component	0,7
P14324	FDPS	Farnesyl pyrophosphate synthase	0,68
Q9Y226	NUDC	Nuclear migration protein nudC	0,68
P08779	KRT16	Keratin type I cytoskeletal 16	0,66
P02763	ORM1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	0,66
P11169	SLC2A3/A14	Solute carrier family 2 Facilitated glucose transporter member 3	0,65
Q69BH3	ELSPBP1	Epididymal sperm-binding protein 1	0,63
E5RK69	ANXA16	Annexin A6	0,59

Q8IUA0	WFDC8	WAP four-disulfide core domain protein 8	0,55
U3KQK0	HIST1H2BN	Histone 1 H2BN	0,49

Tabla 37: Lista de proteínas con niveles de expresión significativamente diferentes en prostasomas de varones no normozoospermicos en comparación con prostasomas de varones normozoospermicos. Azul: proteínas descritas en la bibliografía por su implicación en los procesos reproductivos. Rojo: proteínas implicadas en las rutas de producción de energía en el espermatozoide.

Al analizar el registro de proteínas cuyos niveles de expresión varían entre prostasomas aislados a partir de muestras seminales normozoospermicas y no normozoospermicas lo primero que se observó es que varias de estas proteínas han sido previamente descritas en la bibliografía por ser proteínas presentes en el plasma seminal y/o en el espermatozoide con implicación relevante en los procesos reproductivos y en la calidad seminal:

- Histona H2BA (Q96A08)
Variante histónica requerida en la transición histona-protamina.
- Beta-microseminoproteína (P08118)
Una de las proteínas más abundantes en las secreciones de la próstata, actúa inhibiendo la reacción acrosomal.
- Mieloperoxidasa (P05164)
Enzima que elimina el peróxido de hidrógeno combinándolo con cloro para liberar ácido hipocloroso.
- Factor de inhibición de migración de macrófagos (P11169)
Liberado tanto por el epidídimo como por la próstata, participa en la regulación de la maduración del espermatozoide y en la inhibición de la respuesta inmune frente al espermatozoide en el tracto reproductivo femenino.
- Kalikreina 2 (P20151)
Liberada por la próstata, está implicada en el proceso de licuefacción del plasma seminal.

Por otra parte, un estudio de interacciones entre las proteínas identificadas, realizado con la herramienta informática STRING, mostró que, dentro de las proteínas subexpresadas en prostasomas aislados a partir de muestras seminales no normozoospermicas, figuran varias proteínas que interaccionan entre sí (ver **Figura 27**).

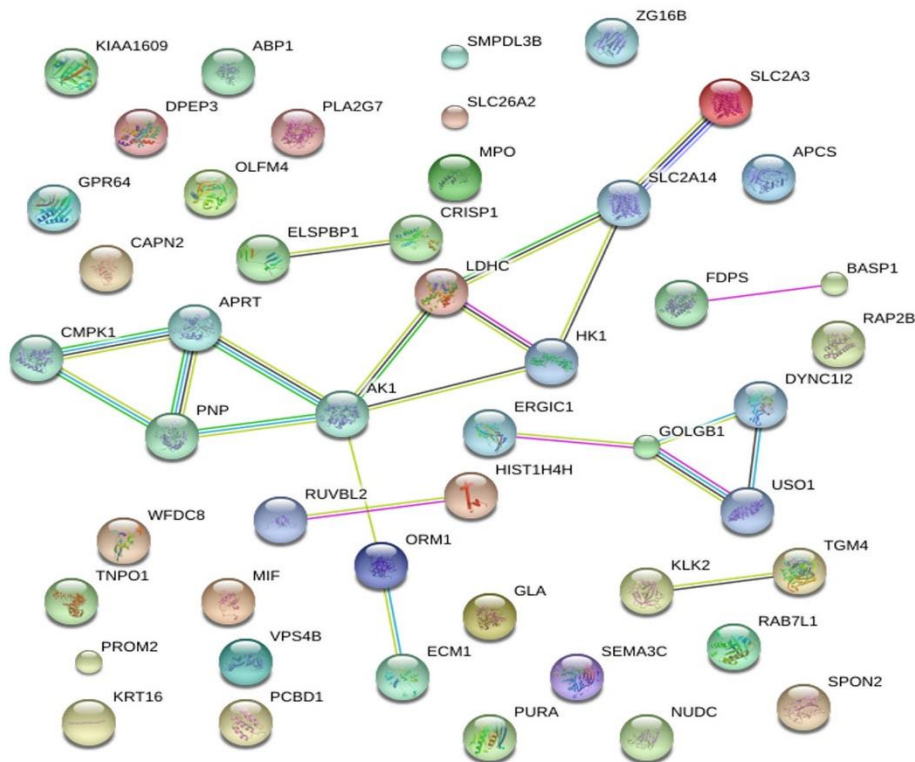


Figura 27: Red de interacciones entre las proteínas subexpresadas en prostasomas aislados a partir de muestras no normozoospermicas.

De entre estas proteínas que interaccionan tienen especial importancia 7 proteínas que forman parte de las rutas de producción de energía en el espermatozoide: L-lactato dehidrogenasa C (LDHC), transportador de glucosa 3 (GLUT3), hexokinasa 1 (HK1), adenina fosforribosiltransferasa (APRT), adenilato kinasa 1 (AK1), nucleósido purínico fosforilasa (PNP) y citidina/uridina monofosfato kinasa 1 (CMPK1). En la **Figura 28** se ha esquematizado en qué paso metabólico participa cada enzima.

- Transportador de glucosa 3 (P11169)
Transportador de membrana pasivo (no consume energía). Transporta una variedad de moléculas que incluye: glucosa, 2-deoxyglucosa, galactosa, manosa, xilosa y fucosa pero no transporta fructosa.
- L-lactato deshidrogenasa C (P07864)
Cataliza la interconversión de lactato a piruvato con oxidación/reducción concomitante de NADH a NAD⁺.
- Hexokinasa 1 (P19367)
Cataliza el primer paso esencial en el metabolismo de la glucosa: la conversión de glucosa a glucosa-6P, paso clave en la glucólisis y en la ruta de las pentosas fosfato.

3.3.c) Validación de los resultados del estudio proteico cuantitativo

Una vez identificadas aquellas proteínas que muestran niveles de expresión diferencial entre prostasomas aislados a partir de muestras seminales normozoospermicas y muestras no normozoospermicas se realizó una validación de estos resultados mediante western blot. Dada la relevancia que tiene para el espermatozoide mantener unos niveles de producción de energía elevados se seleccionaron 2 de las proteínas que aparecen subexpresadas en prostasomas y que forman parte de las rutas de producción de energía en el espermatozoide: la hexokinasa I y la lactato deshidrogenasa C.

Como se puede observar en la **Figura 29** y la **Figura 30**, las variaciones en el contenido de proteínas detectadas mediante espectrometría de masas fueron validadas mediante western blot para las proteínas hexokinasa 1 (102 KDa) y lactato deshidrogenasa C (36 KDa). Además de observarse visualmente, las diferencias de expresión resultan claras si se comparan los valores medios obtenidos mediante análisis de imagen de los geles según los cuales los niveles de expresión en prostasomas aislados a partir de muestras seminales no normozoospermicas son un 25% inferiores para la HK1 y un 50% inferiores para la LDHC que los niveles de expresión de las mismas enzimas en prostasomas aislados a partir de muestras seminales normozoospermicas (ver **Tabla 38**, **Tabla 39** y **Figura 31**).

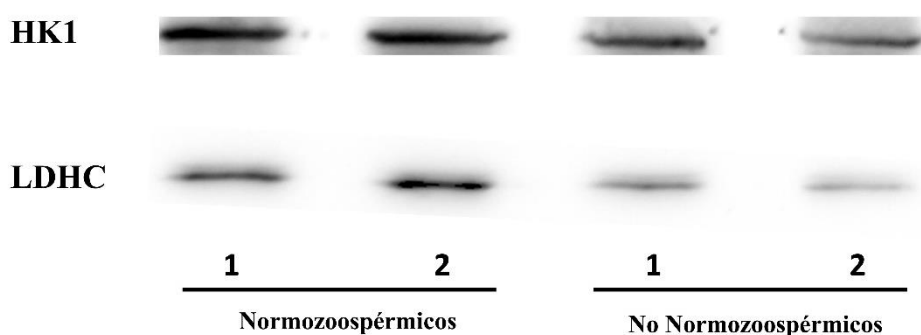


Figura 29: Validación de los niveles de expresión en prostasomas de las proteínas HK1 y LDHC mediante western blot. 1= pools que incluyen las muestras previamente empleadas en la espectrometría de masa. 2= pools preparados con muestras nuevas. HK1 = 102 KDa, LDHC = 36 KDa.

	Normozoospermicos	No normozoospermicos	Ratio No Normos/ Normos
HK1	23723	17808	0.75
LDHC	11722	5266	0.44

Tabla 38: Valores medios obtenidos al realizar el análisis de imagen del gel obtenido en la validación por pools de las proteínas HK1 y LDHC mediante western blot.

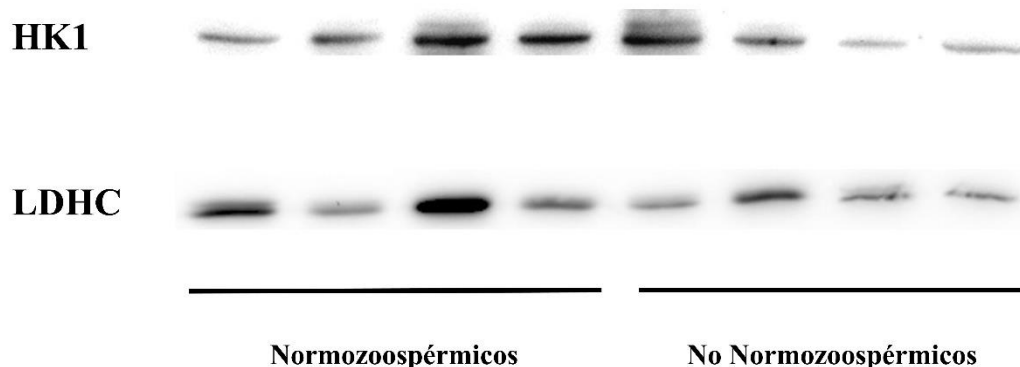


Figura 30: Validación de los niveles de expresión en prostasomas de las proteínas HK1 y LDHC mediante western blot. HK1 = 102 KDa, LDHC = 36 KDa.

	<i>Normozoospermicos</i>	<i>No normozoospermicos</i>	<i>No normos/ Normos</i>
HK1	3919	3004	0.76
LDHC	22436	12669	0.56

Tabla 39: Valores medios obtenidos al realizar el análisis de imagen del gel obtenido en la validación por muestras de las proteínas HK1 y LDHC mediante western blot.

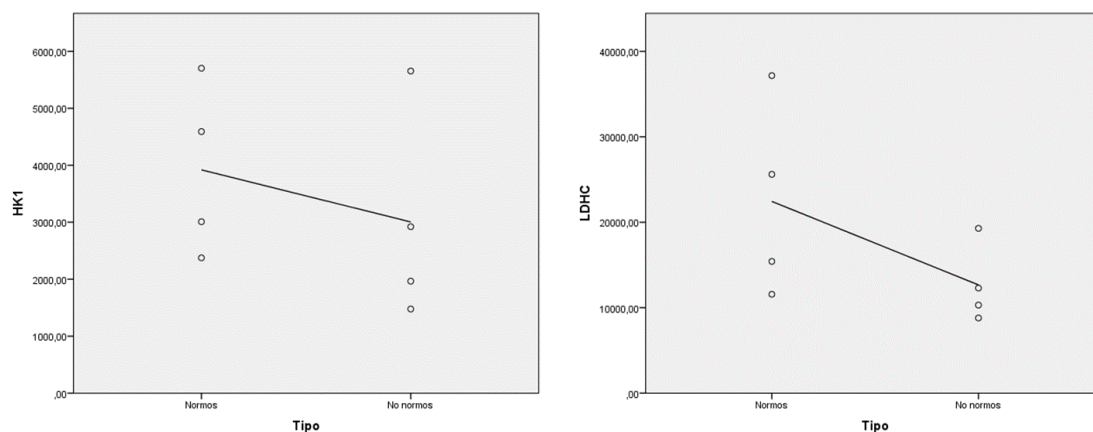


Figura 31: Variaciones de expresión de las proteínas HK1 y LDHC presentes en los prostasomas en función de la calidad de la muestra seminal según los resultados obtenidos mediante western blot.

3.4) Estudio del contenido de DNA de los prostasomas.

Las medidas de concentración obtenidas a partir de los valores de absorbancia para el DNA extraído de prostasomas aislados a partir de eyaculados normozoospermicos y no normozoospermicos (**Tabla 40**) indican que los segundos tienen una concentración de DNA ligeramente superior (14.7 vs 21.8 ng/μL respectivamente).

<i>Pool de prostasomas</i>	<i>A260</i>	<i>A280</i>	<i>A260/A280</i>	<i>Concentración DNA (ng/μL)</i>
<i>Normozoospermicos</i>	0.293	0.166	1.76	14.70
<i>No Normozoospermicos</i>	0.435	0.238	1.83	21.80

Tabla 40: Medidas de absorbancia y concentración de DNA para los prostasomas aislados de muestras normozoospermicas y no normozoospermicas.

Los patrones de fragmentos de DNA observados mediante el sistema BioAnalyzer fueron similares para ambos tipos de prostasomas (ver **Figura 32**). En ambos casos el 95% de los fragmentos detectados se encontraron en un rango de tamaños de 500 a 18000 pb.

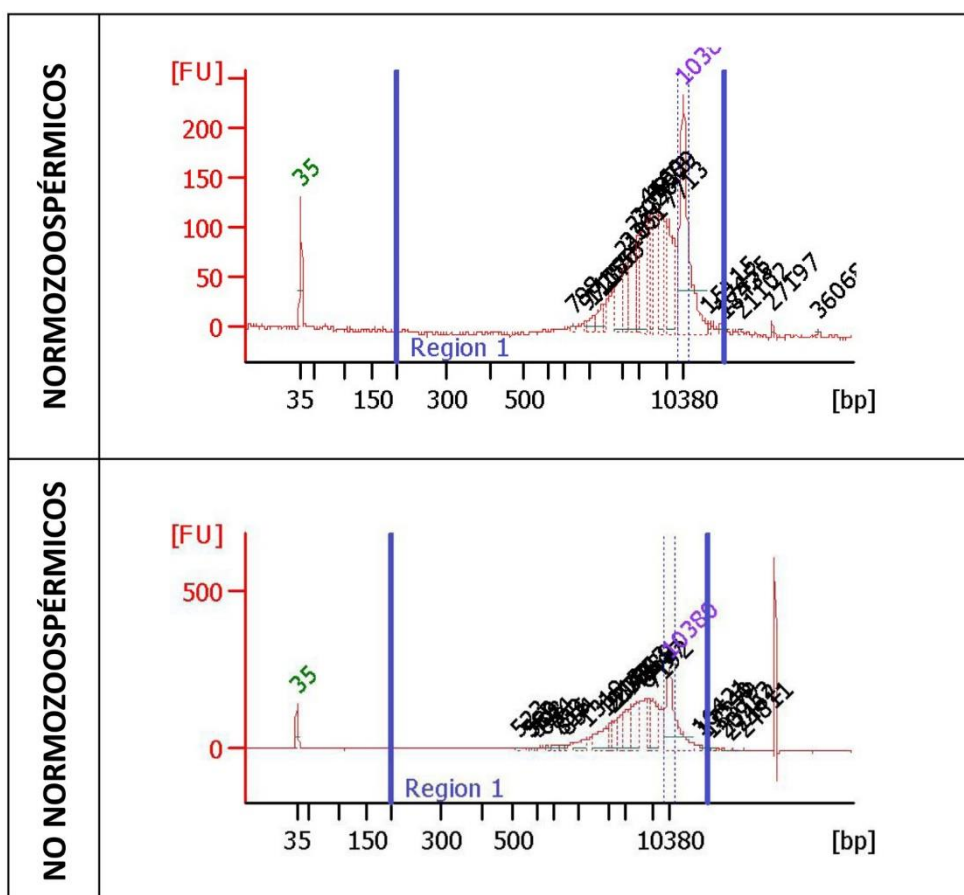


Figura 32: Perfiles de DNA presente en los prostasomas observados mediante el sistema BioAnalyzer.

El alineamiento de las secuencias de DNA de los prostasomas (ver **Tabla 41**) mostró que ambos tipos de prostasomas contienen secuencias de todos los cromosomas, tanto autosomas como cromosomas sexuales, con coberturas de en torno al 3% en todos los casos excepto para el cromosoma X. Además, no se observaron diferencias entre los dos tipos de prostasomas en cuanto al grado de cobertura. Por otro lado, se detectó también la presencia de DNA mitocondrial, con un porcentaje de cobertura muy superior a la obtenida para los cromosomas, y observándose que los prostasomas aislados a partir de

muestras no normozoospermicas tienen una cobertura del DNA mitocondrial en torno a un 10% inferior a la que tienen los aislados a partir de muestras normozoospermicas.

Cromosoma	Normozoospermicos (% cobertura)	No normozoospermicos (% cobertura)
1	3,31	3,24
2	3,12	3,07
3	3,11	3,11
4	3,12	3,11
5	3,15	3,11
6	3,01	2,99
7	3,1	3,04
8	3,1	3,04
9	3,13	3,06
10	3,24	3,19
11	3,11	3,03
12	3,06	3,03
13	3,02	3,01
14	3,06	3,03
15	2,98	2,95
16	3,54	3,4
17	3,01	2,94
18	3,06	3,08
19	3,17	3,01
20	3,4	3,3
21	3,6	3,49
22	3,29	3,15
X	1,57	1,59
Y	3,19	3,15
DNA mitocondrial	49,88	41,16

Tabla 41: Porcentajes de cobertura del DNA presente en los prostasomas para los distintos cromosomas para el DNA mitocondrial.

DISCUSIÓN

1) Análisis descriptivo de la población

En la primera parte de la presente tesis doctoral se estudió la asociación de 8 polimorfismos localizados en genes codificantes para enzimas de los sistemas espermáticos de defensa frente al estrés oxidativo con la presencia de infertilidad masculina. Específicamente se incluyeron en el estudio 2 polimorfismos presentes en genes codificantes para enzimas de reparación del DNA (OGG1 Ser326Cys y XRCC1 Arg399Gln), 4 polimorfismos presentes en genes codificantes para enzimas de los sistemas antioxidantes (SOD2 Ile58Thr, SOD2 Ala16Val, CAT C-262T y GPX1 Pro200Leu) y 2 variantes nulas de dos enzimas de la familia de la GST (GSTT1 null y GSTM1 null).

Como primera aproximación, como se observa en la **Tabla 42**, se compararon las frecuencias genotípicas recogidas en este estudio con las frecuencias genotípicas de dichos polimorfismos en otras poblaciones europeas (166), (167, 168), (169), (170), (171).

	Otras poblaciones europeas			Nuestra población		
	HS	HT	HnS	HS	HT	HnS
OGG1 Ser326Cys	0.40-0.63	0.20-0.50	0-0.18	0.59	0.37	0.04
XRCC1 Arg399Gln	0.32-0.49	0.40-0.55	0.09-0.17	0.43	0.44	0.13
SOD2 Ile54Thr	0.98-1.00	0.01-0.02	0.00	1.00	0	0
SOD2 rs4880	0.06-0.54	0.28-0.47	0.08-0.52	0.21	0.49	0.30
CAT C-262T	0.57-0.63	0.30-0.37	0.03-0.05	0.65	0.30	0.05
GPX Pro200Leu	0.41-0.59	0.35-0.45	0.06-0.15	0.43	0.45	0.12
GSTT			0.13-0.26			0.21
GSTM			0.42-0.60			0.51

Tabla 42: Frecuencias genotípicas obtenidas en otros estudios con poblaciones europeas para los polimorfismos analizados en la presente tesis. HS = homocigoto salvaje. HT = heterocigoto. HnS = homocigoto no salvaje.

Observamos que:

- Los polimorfismos analizados para los genes de reparación del DNA, OGG1 Ser326Cys y XRCC1 Arg399Gln, presentan en nuestra población de estudio frecuencias genotípicas dentro de los límites obtenidos en otras poblaciones europeas.
- Para el polimorfismo SOD2 Ile58Thr en nuestra población solo aparece el genotipo Ile/Ile. Esto coincide con lo observado en otros estudios con poblaciones europeas en los que no se ha detectado en ningún caso el homocigoto Thr/Thr mientras que la frecuencia del heterocigoto ha sido prácticamente nula.

- Para el polimorfismo GPX Pro200Leu y las variantes nulas de las enzimas GSTT1 y GSTM1 las frecuencias genotípicas en nuestra población aparecen dentro de o muy cerca de los límites obtenidos en otras poblaciones europeas para los mismos polimorfismos.
- Para el polimorfismo SOD rs4880 el genotipo heterocigoto mostró en nuestra población una frecuencia ligeramente superior a la mostrada en otros estudios con otras poblaciones europeas (0.49 vs 0.28 a 0.47 respectivamente).
- Para polimorfismo CAT C-262T los genotipos heterocigoto y homocigoto TT aparecen en nuestra población con una frecuencia situada justo en los límites de las observadas en otras poblaciones europeas, mientras que el homocigoto CC aparece con una frecuencia ligeramente superior a la recogida en otros estudios con otras poblaciones europeas (0.65 vs 0.57 a 0.63).

Por consiguiente, las frecuencias genotípicas observadas en la población de nuestro estudio para los distintos polimorfismos analizados estarían dentro de los rangos de frecuencias observados para los mismos polimorfismos en otros estudios previamente publicados llevados a cabo con poblaciones europeas. Nuestros resultados serían los primeros para estos polimorfismos en población masculina española.

Por otra parte, el análisis de los parámetros del seminograma en la población muestral completa (393 muestras), en el que se observa que la media de casi todos los parámetros está dentro de la normalidad establecida por la OMS, apoya la idea planteada por muchos expertos en el campo de que el seminograma clásico por sí solo no permite realizar una clasificación adecuada entre varones fértiles e infértiles: una población muestral como la nuestra, con un 79.6 % de individuos con problemas de infertilidad, ofrece de media valores normales para el seminograma clásico.

2) Análisis genotípico de la población

En el presente estudio se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre la presencia de infertilidad masculina y 2 de los polimorfismos estudiados, XRCC1 Arg399Gln y CAT C-262T, mostrando en ambos casos el genotipo heterocigoto un efecto protector o beneficioso.

2.1) Análisis genotípico para las enzimas de reparación

La ruta de reparación del DNA Base Excisión Repair (BER) es una ruta especialmente encargada de la detección y reparación de bases anómalas del DNA, especialmente la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, la cual aparece en el DNA como consecuencia de la oxidación de la guanosina original por efecto del estrés oxidativo. La correcta reparación de este tipo de bases anómalas resulta de vital importancia para la funcionalidad celular ya que, de no ser reparadas, pueden provocar mutaciones durante las subsiguientes divisiones celulares; esto se debe a que la 8-OHdG aparee tanto con la citosina como con la timina pudiendo por tanto producirse transversiones G:C → A:T.

La ruta BER de reparación del DNA está organizada fundamentalmente por 3 enzimas: la oxoguanosine glycosylase (OGG1), la apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) y la X-ray repair cross complementing group 1 (XRCC1). En concreto, la oxoguanosine glycosylase (OGG1) detecta la presencia de la 8-OHdG y la elimina generando un sitio abásico. Este sitio es reconocido e hidrolizado por la endonucleasa APE1 permitiendo así el reemplazo de la base purínica o pirimidínica por la polimerasa β asociada a la proteína de andamiaje XRCC1.

A diferencia de las células somáticas, el espermatozoide tiene buena parte de los sistemas de reparación del DNA inactivados (172). En el caso de la ruta BER (Base Excision Repair System), el espermatozoide únicamente tiene activa la primera enzima de la misma, la OGG1 (127). Esta enzima, presente en el espermatozoide maduro en gran cantidad, reconoce pares de bases 8-OHdG:C y escinde la 8-OHdG, dejando un sitio abásico. Como las siguientes enzimas de la ruta, la APE1 y la XRCC1, ya no están presentes en el espermatozoide maduro, este sitio abásico se mantiene hasta el momento de la fecundación cuando será previsiblemente reparado por la maquinaria de reparación del óvulo. Por contra, la organización de la ruta BER en el óvulo es casi inversa a la organización de la misma en el espermatozoide: aunque están presentes todas las enzimas de la ruta, la OGG1 lo está en cantidades ínfimas.

Esta situación implica que para lograr una correcta reparación de las bases anómalas 8-OHdG que aparecen en el DNA espermático sea necesario un funcionamiento correcto y coordinado de la ruta BER tanto en el espermatozoide como en el óvulo. Así, será necesario primeramente que la enzima OGG1 presente tanto en espermátidas como en el espermatozoide maduro trabaje de una manera eficiente para detectar la presencia de bases 8-OHdG y escindirlas, dado que si esto no ocurre el espermatozoide maduro podría alcanzar el óvulo con un elevado número de bases 8-OHdG en su DNA corriendo el riesgo de que el óvulo, al tener una cantidad muy baja de enzima OGG1, no sea capaz de repararlas tras la fecundación. Por otra parte, dado que el espermatozoide maduro carece del resto de enzimas de la ruta BER, también será importante que el funcionamiento de las mismas en las fases previas de la espermatogénesis sea eficiente de modo que el espermatozoide alcance su fase madura con el menor número de sitios abásicos residuales posibles.

El polimorfismo OGG1 Ser326Cys es una transversion C \rightarrow G localizada en el exón 7 de la enzima coincidiendo con un dominio α -hélice (173). Varios estudios han asociado el alelo Cys con una reducción en la capacidad reparadora de la enzima y una mayor presencia de pares OHdG:C (174), (175); concretamente el grupo de Kohno *et al.* demostró que el alelo Ser posee unos niveles de actividad 7 veces superiores al alelo Cys. Sin embargo, solamente hemos podido encontrar dos estudios que analicen su efecto sobre la fertilidad masculina, ambos llevados a cabo por el mismo grupo. En dichos estudios Ji *et al.* (176), (177) observaron una mayor frecuencia de los genotipos Ser/Cys y Cys/Cys en pacientes que en donantes y relacionaron el genotipo Cys/Cys

con un riesgo de padecer infertilidad 1.73 veces superior al correspondiente al genotipo Ser/Ser.

En nuestro estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de los distintos genotipos entre pacientes y donantes, aunque si se observa un ligero incremento de la frecuencia del homocigoto Ser/Ser en donantes. Del mismo modo, al calcular los odds ratio de padecer infertilidad para cada genotipo, aunque no se obtuvieron valores estadísticamente significativos, sí que se obtuvieron valores por encima de 1.128 y 1.668 para los genotipos Ser/Cys y Cys/Cys respectivamente y por de 0.731 para el Ser/Ser lo cual indica que este último podría tener un cierto efecto beneficioso en comparación con los otros dos. Por consiguiente, nuestros resultados estarían en línea con los resultados obtenidos por Ji *et al.*

Por otra parte, al comparar las frecuencias de cada genotipo entre donantes, pacientes con diagnóstico normozoospermico y pacientes con diagnóstico no normozoospermico se observó que, si bien dichas frecuencias variaban poco entre los dos primeros grupos, sí que existían diferencias importantes y estadísticamente significativas al comparar con el grupo de los pacientes con diagnóstico no normozoospermico ($P=0.002$). En concreto, en este último grupo se observó un incremento de más del 20% en la frecuencia del genotipo heterocigoto y de más del doble en la del homocigoto Cys/Cys. Estas observaciones nos llevan a plantear la hipótesis de que la variante alélica Cys sería una variante menos efectiva que se relacionaría con la aparición de defectos en el espermatozoide y con un seminograma alterado.

Para determinar cuál de los parámetros del seminograma se ve más afectado por la presencia del alelo Cys se compararon las medias de los distintos parámetros entre genotipos obteniéndose diferencias casi significativas para la morfología ($P=0.056$) con valores por debajo del índice de referencia de la OMS para los genotipos Ser/Cys (3.76) y Cys/Cys (3.66). Además, para el resto de los parámetros analizados también se observó que el homocigoto Ser/Ser presenta los mejores valores.

Estas observaciones nos indican que el alelo Cys podría ser una variante menos activa con menor capacidad de reparación que generase efectos visibles sobre la calidad del espermatozoide, efectos que de acuerdo a lo visto tanto al comparar los valores del seminograma clásico entre genotipos como al comparar frecuencias entre diagnósticos, parece que tendrían consecuencias especialmente importantes sobre la morfología del espermatozoide. Es posible que esto se deba a que la no reparación de la presencia de bases 8-OHdG en el DNA provoque un incremento tanto de la fragmentación del DNA como de la presencia de mutaciones en el mismo.

La enzima XRCC1 es una enzima clave de la ruta BER que se encarga de atraer al resto de enzimas de la ruta a los puntos en los cuales ha actuado la OGG1 (178), (179). Varios estudios han demostrado que su expresión en testículo es muy superior a su expresión en otros tejidos por lo que se ha propuesto que podría tener un papel

importante durante la espermiogénesis en la reparación de daños en el DNA producidos durante la meiosis (180), (181); por el contrario, la enzima XRCC1 no está presente en el espermatozoide maduro. Como consecuencia niveles de actividad reducidos de la enzima XRCC1 supondrían una menor capacidad de reparación del daño producido en el DNA espermático durante la espermiogénesis el cual, al no poder ser reparado en el espermatozoide maduro, pasaría al óvulo durante la fecundación. En el polimorfismo XRCC1 Arg399Gln se produce una sustitución de una arginina por una glutamina como consecuencia de un cambio de una guanina por una adenina y coincidiendo con el dominio de unión a la poli-ADP-ribosa-polimerasa (182).

En nuestro estudio se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas entre pacientes y donantes con un incremento de la frecuencia del genotipo heterocigoto del 15% y una reducción de la frecuencia del homocigoto Arg/Arg del 20% en la cohorte de donantes fértiles. Así mismo, al determinar los odds ratio de infertilidad para cada genotipo se obtuvo un efecto protector estadísticamente significativo para el genotipo heterocigoto (OR=0.555, P=0.019)). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por el grupo de Gu *et al.* (130), (131) pero no con los obtenidos por el grupo de Zheng *et al.* (183) quienes relacionaron el alelo Gln con un mayor riesgo de infertilidad idiopática. Estas diferencias podrían estar causadas por la variación étnica de las poblaciones analizadas puesto que los citados estudios se desarrollaron con población de origen asiático mientras que en el nuestro la población analizada es de origen caucásico.

Cuando se compararon los valores de los parámetros del seminograma clásico entre genotipos se obtuvo el mismo patrón para todos los casos: el peor valor para el homocigoto Arg/Arg y el mejor para el homocigoto Gln/Gln con el heterocigoto mostrando valores intermedios. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para el parámetro concentración. Esto nos podría estar indicando que el alelo Gln codifica para una variante de la enzima con mayor actividad y que la mejoría en la calidad seminal asociada a dicha variante aumenta al incrementarse el número de alelos del mismo. Sin embargo, el patrón descrito no se cumple en el caso de los parámetros fragmentación y estrés oxidativo para los cuales, aunque se mantiene que el homocigoto Gln/Gln muestra los mejores valores, es el heterocigoto el que muestra los peores.

Finalmente, también se obtuvieron diferencias significativas con una agrupación más amplia en donantes, pacientes normozoospermicos y pacientes no normozoospermicos. Se observó un incremento muy importante (casi el doble) de la frecuencia del genotipo homocigoto Arg/Arg en pacientes normozoospermicos en comparación con los donantes (P=0.006). Esto concuerda con lo observado tanto en el análisis de odds ratio como al estudiar los valores del seminograma en los que también se obtuvieron peores resultados para el genotipo homocigoto Arg/Arg. Parece que el homocigoto Arg/Arg supondría una variante menos activa que incrementaría el riesgo de infertilidad en el varón. De acuerdo a los valores obtenidos en el seminograma en los que se observa una

reducción significativa de la concentración espermática para el genotipo homocigoto Arg/Arg, planteamos la hipótesis de que este genotipo podría suponer un menor grado de reparación de los sitios abásicos generados por la ruta BER, lo que llevaría a la aparición de procesos apoptóticos a nivel de espermátida provocando una reducción de la concentración. En línea con esta hipótesis, Manente *et al.* demostraron recientemente que porcentajes elevados de fragmentación en el DNA correlacionan con un incremento de la activación de las cascadas apoptóticas y con los diagnósticos de oligo y necrozoospermia (184).

2.2) Análisis genotípico para las enzimas antioxidantes

Como ya se indicó en la introducción de esta tesis, las enzimas antioxidantes son enzimas que metabolizan los radicales reactivos de oxígeno logrando así su eliminación. Espermatozoides y plasma seminal cuentan con una red de enzimas con capacidad antioxidante que incluye superóxido dismutasas, catalasa, glutatión peroxidasas, glutatión transferasas, peroxirredoxinas y tioredoxinas. Existen varios estudios que han relacionado la presencia de niveles reducidos de estas enzimas con el desarrollo de infertilidad masculina (94), (185).

En el presente estudio se ha estudiado la relación de cuatro polimorfismos localizados en tres genes codificantes para enzimas de defensa antioxidante, SOD2 Ile58Thr, SOD2 Ala16Val, CAT C-262T y GPX Pro200Leu, y de dos variantes nulas de dos enzimas de la familia de la GST, GSTT1 y GSTM1, con la aparición de infertilidad masculina.

La enzima catalasa (CAT), codificada por un gen que se localiza en el cromosoma 11p3, es, junto con la glutatión peroxidasa y las peroxirredoxinas, una de las enzimas que se encargan de detoxificar el peróxido de hidrógeno liberando agua. Además, esta enzima está considerada como la principal enzima en la respuesta a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, siendo las peroxirredoxinas las encargadas de responder ante concentraciones de peróxido de hidrógeno más cercanas a las fisiológicas. El peróxido de hidrógeno juega un papel esencial en la aparición de infertilidad masculina ya que a concentraciones superiores a las fisiológicas provoca peroxidación lipídica (186), (187). El peróxido de hidrógeno puede aparecer en el plasma seminal directamente como consecuencia de la actividad de los leucocitos o indirectamente como producto de la detoxificación del anión superóxido por la enzima superóxido dismutasa. Se ha demostrado que el plasma seminal de pacientes infértiles presenta una menor actividad de la enzima catalasa y una mayor concentración de peróxido de hidrógeno (99).

En el presente estudio se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas para el SNP localizado en el promotor de la catalasa CAT C-262T entre pacientes infértiles y donantes fértiles ($P=0.002$). Específicamente, el genotipo heterocigoto apareció con casi el doble de frecuencia en donantes en comparación con los pacientes (0.47 vs 0.26), lo cual nos lleva a suponer que la variante alélica T podría ser una variante con un mayor ratio transcripcional que resultase beneficiosa en

situación de heterocigosis. En cualquier caso, nuestras observaciones a nivel de frecuencias genotípicas concordaron con los resultados obtenidos al calcular los odds ratio de padecer infertilidad para cada genotipo para los que se obtuvo que la probabilidad de padecer infertilidad se incrementa en 2.26 veces para el genotipo homocigoto CC en comparación con los otros dos genotipos. Estos resultados se discutirán en profundidad en el apartado 2.3 de la discusión de esta tesis.

Cuando se compararon los valores de los principales parámetros del seminograma tradicional entre los posibles genotipos se observó que los mejores valores aparecieron siempre en aquellos genotipos que contenían el alelo T. No obstante, solo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para los parámetros motilidad ($P=0.047$) y morfología ($P=0.024$), aunque comparaciones subsiguientes pareja a pareja únicamente revelaron diferencias significativas en el caso del parámetro morfología entre los genotipos CT y CC siendo el CT el que mostraba mejores valores. También se obtuvieron diferencias casi significativas para el parámetro concentración. Por otra parte, para los dos parámetros más directamente relacionados con el estrés oxidativo, fragmentación del DNA y niveles de estrés oxidativo, también se obtuvieron los mejores datos para el genotipo CT.

La superóxido dismutasa 2 (SOD2) es una enzima antioxidante mitocondrial codificada por un gen que se localiza en el cromosoma 6q25 que cataliza la detoxificación de los radicales superóxido liberando peróxido de hidrógeno y oxígeno como productos. En el polimorfismo SOD2 Ala16Val se produce un cambio de una alanina por una valina en la posición -9 de la secuencia N-terminal de reconocimiento para transporte a la mitocondria; se ha demostrado que en la variante Val se produce un cambio conformacional en el péptido señal que provoca el arresto de la proteína en la membrana interna de la mitocondria reduciendo así su transporte a la matriz de la mitocondria y la posterior formación del tetrámero activo (188). Varios estudios han relacionado la variante Val con enfermedades relativas al estrés oxidativo como son las enfermedades coronarias (188), la diabetes mellitus (189) y diversos cánceres mientras que otros estudios han relacionado la variante Ala con neoplasias de mama (190), próstata (191) y colon (192). Aparentemente parece que estas observaciones se podrían explicar en base a un balance global de estrés oxidativo: dado que esta enzima elimina los radicales superóxido en la mitocondria produciendo H_2O_2 como subproducto, el cual es a su vez un tipo de ROS, tan contraproducente sería un funcionamiento reducido de la enzima que no llegue a eliminar suficientes radicales superóxido como un funcionamiento excesivo de la misma que libere cantidades excesivas de H_2O_2 que la célula no logre eliminar. A la vista de las observaciones existentes parece que dependiendo del tipo celular estudiado y su sensibilidad/resistencia al estrés oxidativo el efecto de este polimorfismo variaría. En el caso de la célula espermática el rango de H_2O_2 entre niveles fisiológicos y dañinos es muy estrecho. Aunque el espermatozoide necesita unos niveles mínimos de este compuesto para llevar a cabo reacciones como son la

capacitación o la reacción acrosomal, niveles ligeramente superiores pasan a tener efecto tóxico.

En este estudio se ha observado una representación del alelo Val ligeramente superior en donantes que en pacientes infértiles. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por los grupos de Faure *et al.* (193) y de Yan *et al.* (91) quienes también observaron una mayor presencia del alelo Ala en pacientes infértiles; estos investigadores sugirieron que en realidad la variante Ala podría ser verdaderamente transportada a la mitocondria con mayor eficiencia pero que esto, en lugar de resultar beneficioso podría resultar perjudicial porque se producirían mayores cantidades de peróxido de hidrógeno en la mitocondria que afectarían negativamente a la calidad del espermatozoide. En concordancia con esta hipótesis, en nuestro estudio se ha observado que los genotipos Ala/Val y Val/Val muestran mejores valores para los parámetros del seminograma que el genotipo Ala/Ala, el cual también mostró los mayores odds de padecer infertilidad (OR=1.579).

Por otra parte, el polimorfismo SOD2 Ile58Thr se localiza en el exón 3 del gen y ha sido relacionado con una menor actividad enzimática debida a una mayor inestabilidad de la enzima (96). Concretamente, un estudio realizado por el grupo de Borgstahl *et al.* (194) demostró que este polimorfismo provoca cambios conformacionales en la enzima localizados en una estructura tetramérica que estabiliza los sitios activos y que dicha modificación provoca que la variante alélica Thr tenga una estabilidad térmica entre 15 y 20°C inferior a la variante salvaje; este grupo propuso además que esta reducción en la estabilidad térmica provocaría que la variante alélica Thr tenga una viabilidad muy comprometida a la temperatura corporal humana: a 37°C se inactivaría en 3.2 horas mientras que la variante normal lo haría en 3.1 años. En nuestro estudio no se ha encontrado representación de dicho polimorfismo en nuestra población, habiendo encontrado únicamente el genotipo Ile/Ile tanto en pacientes como en donantes. Es importante resaltar que existen otros estudios con poblaciones europeas en los que también se han encontrado frecuencias genotípicas para el genotipo Ile/Ile superiores al 98% (171), (195). Esta observación sugiere que el genotipo Ile/Ile aparecería extremadamente sobreexpresado en población europea y podría responder a la hipótesis antes mencionada planteada por el equipo de Borgstahl *et al.* según la cual la variante Thr tendría una viabilidad comprometida en condiciones fisiológicas.

La glutatión peroxidasa 1 (GPX1), codificada por un gen que se localiza en el cromosoma 3p21, es una peroxidasa selenio dependiente expresada ubicuamente en humanos que elimina el peróxido de hidrógeno empleando para ello la molécula glutatión. En el polimorfismo GPX1 Pro200Leu se produce una sustitución de una prolina por una leucina en el codón 200 localizado en la región c-terminal de la enzima (196). El grupo de Najafi *et al.* (197), empleando un sistema de predicción por ordenador, concluyó que este polimorfismo se localizaría en la superficie de la enzima en una región no funcional y que por tanto la sustitución de aminoácidos no afectaría ni

a la estructura ni a la estabilidad de la enzima. Contrariamente a esta hipótesis, el grupo de Hu *et al.* (198), en un estudio en cáncer de mama, concluyó que el alelo Leu es menos efectivo que el alelo Pro a la hora de neutralizar radicales peróxido. Nuestros resultados mostraron una mayor presencia del alelo Leu en donantes fértiles que en pacientes infértiles y los mejores valores para la mayoría de los parámetros del seminograma clásico en el genotipo Leu/Leu (la única excepción fue el volumen). Del mismo modo, el genotipo Leu/Leu también mostró los mejores valores para los parámetros relacionados con el estrés oxidativo (fragmentación y niveles de estrés). El cálculo de odds ratio para infertilidad reveló que los dos genotipos que contienen el alelo Leu tienen un efecto ligeramente protector mientras que el genotipo Pro/Pro mostró cierto riesgo de padecer infertilidad (OR=1.27). De manera similar, los odds ratios para los niveles de estrés oxidativo mostraron que los dos genotipos que contienen el alelo Leu se relacionan con menor riesgo de tener niveles altos de estrés oxidativo.

La familia de la glutatión S transferasa (GST) incluye un grupo de enzimas que se encargan de conjugar electrófilos tóxicos y otros intermediarios con la molécula de glutatión permitiendo así la eliminación de los primeros. Las isoenzimas GSTT (cromosoma 1p13.3) y GSTM (cromosoma 22q11.2) presentan sendos alelos nulos como resultado de sendas deleciones. Existen diversos estudios que han intentado clarificar la relación entre estas variantes nulas y la presencia de infertilidad masculina pero no se ha logrado alcanzar un consenso. En el caso de la GSTM, varios estudios han asociado el genotipo nulo con un mayor riesgo de infertilidad masculina (199), (200) pero también existen estudios que no han encontrado relación alguna (108). De manera similar, aunque varios estudios han mostrado la existencia de una relación entre el genotipo nulo de la GSTT y la infertilidad masculina (201), existen otros estudios que no han encontrado relación e incluso que han encontrado un efecto beneficioso del genotipo nulo sobre la infertilidad masculina (108). Incluso, algunos trabajos han propuesto que los efectos de ambas variantes nulas sobre la fertilidad masculina estarían influidos por los niveles de exposición a contaminación aérea (202). En nuestro estudio se observaron frecuencias genotípicas y valores de odds ratios de infertilidad prácticamente similares para pacientes y donantes con respecto a la GSTT mientras que el genotipo nulo de la GSTM mostró una frecuencia genotípica ligeramente superior en pacientes que en donantes y sus odds ratios mostraron mayor riesgo de infertilidad masculina (OR=1.225) que la variante normal. También se observaron diferencias interesantes en los odds ratios para estrés oxidativo, con probabilidades de tener altos niveles de estrés oxidativo en torno a 1.5 veces superiores para las variantes nulas con respecto a las salvajes en ambas enzimas GSTs. En consecuencia, nuestros resultados concuerdan con la hipótesis más aceptada de que ambas variantes nulas tendrían un efecto perjudicial para la fertilidad masculina.

2.3) Polimorfismo CAT C-262T e infertilidad masculina

De entre todas las variantes génicas analizadas en esta tesis fue el polimorfismo CAT C-262T para el que se obtuvieron los resultados estadísticamente más concluyentes respecto a su relación con la ocurrencia de infertilidad masculina. Por esta razón y dada la importancia fisiológica de esta enzima para el funcionamiento del espermatozoide se realizaron estudios funcionales para los distintos genotipos de dicho polimorfismo.

La catalasa (CAT) es una enzima antioxidante que ha sido encontrada en prácticamente todos los organismos aerobios conocidos. La catalasa actúa eliminando el peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua y oxígeno y, aunque existen otras 2 enzimas capaces de realizar esa misma función, la glutatión peroxidasa y la peroxirredoxina, se considera que la catalasa es la que tiene la mayor relevancia en la respuesta a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno mientras que las otras dos actuarían en situación de normalidad para mantener bajo control los niveles fisiológicos de peróxido de hidrógeno necesarios para activar ciertas respuestas celulares.

En humanos la enzima catalasa está localizada en el cromosoma 11p13. El gen consta de 33138 pares de bases e incluye 13 exones y 12 intrones que oscilan entre 400 bases y 103.5 KBases, estando el intrón de mayor tamaño entre los exones 1 y 2. El promotor del gen es un promotor irregular rico en pares GC (67%) y sin caja TATA pero con varias repeticiones de los motivos GGGCGG (posiciones -71, -281 y -314) y CCAAT (posiciones -97, -126 y -229) lo que origina múltiples puntos de inicio de la transcripción (ver **Figura 33**).

```
gtccaggggcggcctgaaggatgctgataaccgggagcccgccctgggtcggctatccgggcacccgggcccggggcgagg  
-320  
ctctcaattgctggccagagcgggacacctcttcgcaccctctgggtatctcgggtcttcaggcctcctcgggagagccctgctccg  
  
agcccatgggcttcaatctggcctgctagcgccgagcagcaatcagaaggcagtcctccgagggggcgaggaggggtgg  
  
tgctgattggctgagcctgaagtgcacgggtctcggggcaacaggcagatt  
-1
```

Figura 33: Promotor de la enzima catalasa. Aparecen resaltados los elementos GGGCGG (azul) y CCAAT (verde) así como el polimorfismo C-262T (rojo).

La enzima funcional es un homotetrámero de 244KDa conformado por 4 subunidades idénticas de 526 aminoácidos (59.7KDa) cada una; cada subunidad contiene un grupo hemo (Iron (III) protoporphyrin) que la protege frente a la inactivación y una molécula de NADPH. En general, la enzima catalasa tiene una localización intracelular, bien en el interior de los peroxisomas o bien libre en el citosol, pero también puede aparecer ocasionalmente a nivel extracelular formando parte de los biofluidos. En humanos se expresa en prácticamente todos los tejidos siendo en el hígado, el riñón y los eritrocitos

donde aparece en mayor concentración y el tejido conectivo donde aparece en menor concentración. A nivel reproductivo se expresa en todos los órganos tanto del tracto femenino como del masculino, así como en la placenta.

La enzima catalasa tiene un importante papel dentro de la muestra seminal ya que no solo es una de las principales enzimas antioxidantes del plasma seminal, sino que además también participa en la ruta de capacitación espermática inducida por óxido nítrico. Aparece en el plasma seminal en gran cantidad al ser expresada por todas las partes del tracto reproductivo masculino, especialmente por la próstata y las vesículas seminales. Por el contrario, en el interior del espermatozoide aparece en concentraciones mucho más bajas, estando incluso ausente en espermatozoides de algunas especies como el conejo, el ratón o el toro. En el caso del ser humano, está presente tanto en el plasma seminal como en el propio espermatozoide, aunque en este último aparece con una concentración muy baja. Varios estudios han correlacionado los niveles de actividad catalasa en el plasma seminal con la calidad espermática aunque sin alcanzar un consenso (ver **Tabla 43**).

Actividad CAT	Estudio
Controles > Pacientes	Zelen <i>et al.</i> , 2010 (99)
	Macanovic <i>et al.</i> , 2015 (185)
	Shiva <i>et al.</i> , 2011 (203)
	Ramya <i>et al.</i> , 2011 (204)
	Al-Azzawie <i>et al.</i> , 2014 (205)
	Bousrane <i>et al.</i> , 2017 (206)
Controles ≈ Pacientes	Tavilani <i>et al.</i> , 2008 (207)
	Abdallah <i>et al.</i> , 2009 (208)
	Zini <i>et al.</i> , 2000 (209)
Controles < Pacientes	Sin registros

Tabla 43: registro de estudios que han correlacionado los niveles de actividad catalasa seminal con la calidad espermática.

En el SNP estudiado en esta tesis, el SNP CAT C-262T, se produce una sustitución de una citosina por una timina en la posición -262 del promotor. Se piensa que este polimorfismo afectaría a la unión de factores de transcripción en el promotor y en consecuencia influiría en la expresión del gen. Existen múltiples estudios que han relacionado la presencia de este polimorfismo con diversas enfermedades (ver **Tabla 44**).

Enfermedad	Estudio	Conclusiones
Cáncer de próstata	Hu <i>et al.</i> , 2007 (210)	CT/TT → mayor riesgo
	Tefik <i>et al.</i> , 2013 (96)	TT → mayor riesgo y peor pronóstico
Migraña	Saygi <i>et al.</i> , 2015 (211)	Ninguna asociación
Cáncer de cérvix	Castaldo <i>et al.</i> , 2014 (212)	TT → mayor riesgo
Cáncer de mama	Ahn <i>et al.</i> , 2005 y 2006 (213, 214)	T → mayor riesgo
	Quick <i>et al.</i> , 2008 (215)	T → mayor riesgo en no caucásicas
	Saadat <i>et al.</i> , 2014 (216)	Ninguna asociación
Endometriosis	Zarafshan <i>et al.</i> , 2015 (217)	CC → mayor riesgo
Lupus	Ghaly <i>et al.</i> , 2012 (218)	CT/TT → peor pronóstico
Asbestosis	Franko <i>et al.</i> , 2008 (219)	TT → riesgo ligeramente elevado
Alzheimer	Capurso <i>et al.</i> , 2007 (220)	Ninguna asociación
Asma	Mak <i>et al.</i> , 2006 (221)	T → menor riesgo en no fumadores
	Islam <i>et al.</i> , 2007 (222)	T → mayor riesgo en niños hispanos
Colitis ulcerosa	Khodayari <i>et al.</i> , 2013 (223)	CT → mayor riesgo
Carcinoma hepatocelular	Ezzikouri <i>et al.</i> , 2010 (224)	TT → mayor riesgo
Fallo renal	Perianayagam <i>et al.</i> , 2007 (225)	CC → peor pronóstico
Hiperqueratosis	Ahsan <i>et al.</i> , 2003 (226)	CC/CT → mayor riesgo
Artritis reumatoide	Grabar <i>et al.</i> , 2009 (227)	T → menor riesgo
Diabetes	Chistiakov <i>et al.</i> , 2004 y 2006 (228, 229)	C → mayor riesgo de DMI
	Dutkiewicz <i>et al.</i> , 2010 (230)	Ninguna asociación
Cáncer general	Shen <i>et al.</i> , 2015 (231)	TT → mayor riesgo
Salud general	Christiansen <i>et al.</i> , 2004 (232)	T → mejor estado físico

Tabla 44: Registro de estudios que han analizado la relación entre el polimorfismo CAT C-262T y diversas enfermedades.

En nuestro estudio se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes infértiles y donantes fértiles en las frecuencias genotípicas del SNP CAT C-262T ($P=0.002$); en concreto, la cohorte control formada por donantes de fertilidad probada presentó una reducción en la frecuencia del alelo homocigoto CC del 60% al 40% y un incremento en la frecuencia del heterocigoto CT de casi el 50% en comparación con la cohorte de pacientes infértiles. Sólo tenemos conocimiento de otros dos estudios publicados que hayan analizado la relación entre el SNP CAT C-262T y la presencia de infertilidad masculina, los estudios de Sabohui *et al.* (233) y Bousnane *et al.* (206) (ver **Tabla 45**). Nuestro estudio concuerda con el de Sabohui *et al.* en que en ambos se encontraron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias

genotípicas entre pacientes y donantes pero las frecuencias genotípicas obtenidas en nuestro estudio son más acordes con las del estudio de Bousnane *et al.*. De hecho, las frecuencias genotípicas obtenidas en nuestro estudio para la cohorte de pacientes son muy similares a las obtenidas en el estudio de Bousnane *et al.* para ambas cohortes mientras que las obtenidas por Sabohui *et al.* difieren mucho de las anteriores, especialmente las del genotipo homocigoto TT. Así, mientras que en nuestro estudio fue el genotipo heterocigoto CT el que parece conferir menor susceptibilidad a padecer infertilidad en el de Sabohui *et al.* lo fue el homocigoto TT (nótese que en ambos casos son los genotipos que contienen el alelo T los que muestran menor susceptibilidad de padecer infertilidad).

Estudio	Casos				Controles				P-Value
	N	CC	CT	TT	N	CC	CT	TT	
Nuestro	313	69	26	5	80	50	47	3	0.002
Sabohui <i>et al.</i>	195	31.79	65.12	3.07	190	24.73	55.26	20	0.00086
Bousnane <i>et al.</i>	111	74	23.1	2.9	104	73.9	22.5	3.6	0.959

Tabla 45: Frecuencias genotípicas del SNP CAT C-262T recogidas en los estudios existentes en relación con la infertilidad masculina. P-Value calculado mediante el test Chi-cuadrado (dado que en cada estudio se emplearon diferentes test estadísticos, para poder comparar se ha calculado para los estudios de Sabohui *et al.* y Bousnane *et al.* el P-Value mediante el test Chi-cuadrado empleando los valores de frecuencias genotípicas reflejados en los artículos). N= número de individuos incluidos en cada cohorte.

Las diferencias en las frecuencias genotípicas observadas entre estudios podrían ser una consecuencia de las características de cada población ya que las poblaciones incluidas en cada uno de los tres estudios son de diferente etnia: caucásica en nuestro estudio, asiática en el de Sabohui *et al.* y africana en el de Bousnane *et al.* (española, iraní y argelina respectivamente). De acuerdo con el estudio de Suzen *et al.*, el polimorfismo CAT C-262T muestra importantes variaciones en las frecuencias genotípicas entre poblaciones (101). Otro aspecto que podría estar influenciando las diferencias en las frecuencias genotípicas observadas entre estudios es la variación en el número de individuos incluidos en cada estudio. Además, existe variación en los criterios de inclusión empleados a la hora de formar las cohortes analizadas ya que, mientras que tanto en nuestro estudio como en el de Sabohui *et al.* la cohorte control está formada por varones de fertilidad probada (varones que han tenido descendencia previa a su inclusión en el estudio), en el caso del estudio de Bousnane *et al.* no se indica explícitamente que hayan empleado este criterio sino que únicamente indican que se trata de “voluntarios fértiles con parámetros seminales normales”. Este aspecto podría estar influyendo en que en este último estudio no se observen diferencias en las frecuencias genotípicas entre pacientes y controles ya que en nuestro estudio hemos observado que, si bien las diferencias en las frecuencias genotípicas entre pacientes y controles de fertilidad probada son importantes y estadísticamente significativas, si comparamos las frecuencias entre pacientes normozoospermicos y no

normozoospermicos, no obtenemos diferencias notables. Llama la atención el hecho de que el estudio de Sabouhi *et al.* presente una frecuencia para el genotipo TT en la corte de donantes muy superior tanto a la recogida en ese mismo estudio para la corte de pacientes como a las recogidas en los restantes estudios para ambas cohortes. Es posible que esté influyendo el hecho de que ellos tienen una cohorte de controles mayor.

De acuerdo con las frecuencias genotípicas obtenidas en nuestro estudio nosotros planteamos la hipótesis de que el alelo T suponga una variante con un mayor nivel transcripcional que resulte beneficiosa en situación de heterocigosis. Esta hipótesis encajaría además con los valores numéricos obtenidos al calcular los odds ratios de infertilidad para cada genotipo según los cuales tanto el homocigoto CC como el heterocigoto CT mostrarían una asociación estadísticamente significativas con la aparición infertilidad: el genotipo CC presentaría un mayor riesgo de padecer infertilidad (OR=2.262) y el genotipo CT tendría un papel protector (OR=0.401).

De entre los distintos parámetros incluidos en el seminograma clásico (volumen, concentración, motilidad, morfología y vitalidad) de acuerdo a nuestros resultados serían la motilidad y la morfología, seguidos por la concentración, los más afectados por el polimorfismo CAT C-262T. En concordancia con lo observado al analizar las frecuencias genotípicas, el genotipo homocigoto CC es el que muestra los peores valores para el seminograma clásico (la media para este genotipo está por debajo del valor referencia de la OMS para la morfología (3.79 vs 4) y en el límite para la motilidad (41.05 vs 39)). Sin embargo, en contra de lo esperado, de entre los dos genotipos que incluyen el alelo T es el TT el que muestra los mejores valores en la mayoría de los parámetros. No obstante, hay que tener en cuenta que el número de varones con este genotipo en nuestra población es muy bajo en ambas cohortes, hecho que también ocurre en otras poblaciones de origen caucásico.

En el caso de los parámetros no incluidos en el seminograma clásico y que además son los más directamente relacionados con el estrés oxidativo, aunque no se obtuvieron diferencias significativas para ninguno de ellos, sí que se observó que el genotipo heterocigoto mostró los mejores valores: menor estrés oxidativo y menor índice de fragmentación en el DNA.

2.3.a) Análisis *in silico* del promotor de la catalasa en la zona del SNP CAT C-262T

Para comprobar si nuestra hipótesis es correcta se realizó primeramente una predicción *in silico* de la unión de factores de transcripción para cada uno de los alelos seguida de estudios de cantidad de enzima (western blot) y actividad enzimática (geles de actividad) para cada genotipo, obteniendo en los tres casos resultados concordantes con nuestra hipótesis.

En la predicción *in silico* de la unión de factores de transcripción se observó que el alelo T supone un incremento importante en el número de factores de transcripción activadores que se unen a la secuencia (8 para el alelo T vs 2 para el alelo C) a la vez

que se pierden las secuencias de unión de 3 represores. Estos resultados no solo concuerdan con nuestra hipótesis, sino que además están en consonancia con los obtenidos por el grupo de Forsberg *et al.* empleando otro programa de predicción de unión de factores de transcripción (MatInspector). Es especialmente importante destacar que uno de los activadores que se unen específicamente al alelo T es el activador Nrf2 el cual es un elemento de activación transcripcional en respuesta a estrés oxidativo vía elementos ARE (Antioxidant Response Element) (ver **Figura 34**). En condiciones de homeostasis el factor de transcripción Nrf2 se encuentra unido de manera constitutiva a la proteína Keap1 de modo que dicha unión promueve la ubiquitinación del factor Nrf2 y su subsiguiente degradación mediante la vía de los proteasomas; en condiciones de estrés oxidativo elevado se produce una disociación del complejo Keap1-Nrf2, quedando este libre. Una vez libre, el factor Nrf2 es fosforilado y traslocado al núcleo donde activa la expresión de diversas proteínas antioxidantes mediante la unión a las secuencias ARE presentes en los promotores de dichos genes (234). Existen estudios que han demostrado que la expresión de la enzima catalasa en respuesta a altos niveles de estrés oxidativo esta mediada por la ruta de señalización NRF2-ARE (235), (236) y que hay una correlación positiva entre los niveles de mRNA del factor NRF2 y de la enzima catalasa en el espermatozoide (237).

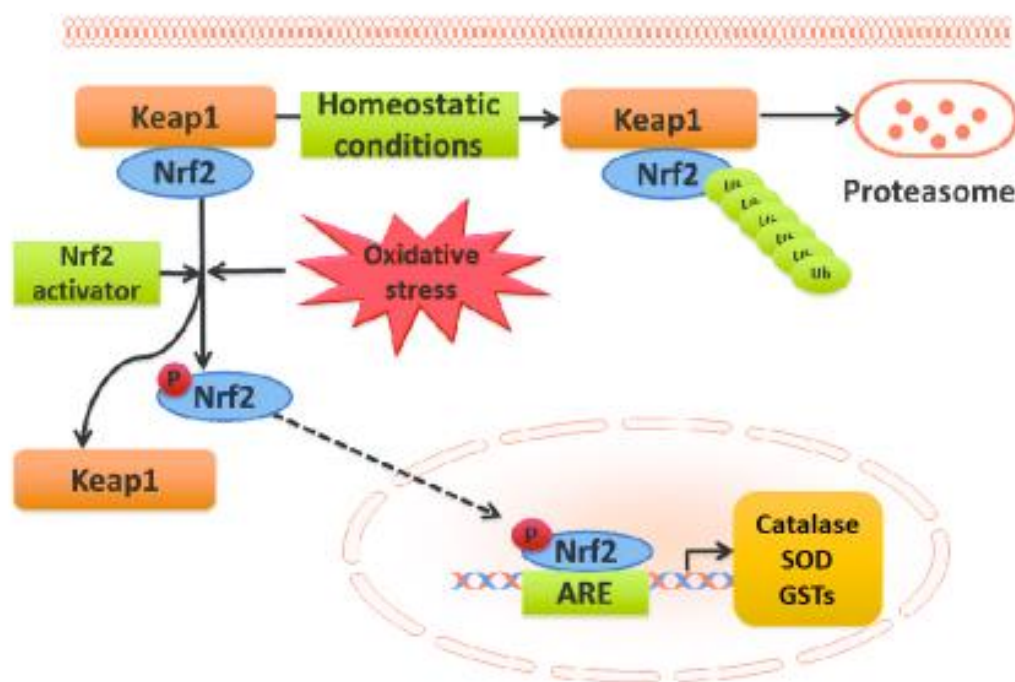


Figura 34: Funcionamiento del factor de transcripción Nrf2. Adaptado de Chen et al. (234).

2.3.b) Análisis de expresión de la catalasa en plasma seminal y espermatozoides

Con el estudio de cantidad y actividad catalasa lo primero que se observa es que existe una relación positiva estadísticamente significativa entre la cantidad de enzima catalasa presente en el plasma seminal y la actividad catalasa detectada en el mismo. Esta

observación resulta importante a la hora de comparar los niveles de cantidad y actividad de la enzima entre genotipos ya que nos indica que, en el caso de existir diferencias entre los mismos, estas diferencias se deberán principalmente a variaciones en los niveles de expresión de la enzima y no a la existencia de cantidades elevadas de enzima inactivada.

Al comparar los niveles de cantidad y actividad de la enzima catalasa entre genotipos se observó que en ambos casos el genotipo heterocigoto CT es el que tiene los valores más altos y el homocigoto CC el que tiene los más bajos. El genotipo homocigoto TT mostró valores intermedios para ambas medidas, ligeramente superiores a los mostrados por el homocigoto CC. Además, en el caso de la actividad enzimática las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas ($P=0.003$), mostrando el genotipo heterocigoto niveles de actividad catalasa en plasma seminal 2.5 veces superiores al genotipo CC.

Respecto a la variación en la cantidad de enzima en función del genotipo del polimorfismo CAT C-262T, nuestros resultados no son completamente concordantes con los resultados obtenidos en el único estudio que hemos podido encontrar en el que se haya realizado esta misma valoración. El grupo de Foresberg *et al.* determinó la concentración de enzima catalasa en sangre en 29 varones y comparó los resultados en función del genotipo para el SNP CAT C-262T obteniendo, al igual que nosotros, que el homocigoto CC mostraba los valores más bajos. Sin embargo, en su caso los valores más altos los obtuvieron para el genotipo homocigoto TT y las diferencias entre genotipos fueron menos notables que en nuestro estudio. En cualquier caso, sí coinciden ambos estudios en que aquellos genotipos que contienen el alelo T muestran mayores concentraciones de enzima catalasa que el genotipo homocigoto CC.

Por otra parte, con respecto al estudio de actividad catalasa seminal, nuestros resultados no coinciden con los obtenidos en otros estudios publicados anteriormente en los cuales se observaron los mayores niveles de actividad catalasa para el genotipo homocigoto CC y los menores para el genotipo homocigoto TT (206), (238), (239), (225), (240). Es importante resaltar que nuestro estudio difiere de los estudios mencionados tanto en el tipo de muestra utilizada como en la técnica empleada para medir la actividad catalasa: mientras que nosotros hemos medido la actividad catalasa en plasma seminal empleando para ello geles de actividad en el resto de estudios revisados se ha medido la actividad catalasa en sangre empleando para ello métodos espectrofotométricos. Esta puntualización podría ser clave para la interpretación de las diferencias observadas en la comparación de los resultados del presente estudio con los resultados de los estudios anteriormente publicados y la explicación podría ser la siguiente.

Por una parte, en nuestro estudio, al emplear geles de actividad, las distintas enzimas que componen el plasma seminal están separadas y la actividad que estamos midiendo es inequívocamente actividad catalasa, en el resto de estudios, al emplear métodos espectrofotométricos que miden la eliminación de peróxido de hidrógeno en la muestra

completa, la actividad que se mide podría no ser únicamente actividad catalasa sino también actividad de otras enzimas capaces también de eliminar el peróxido de hidrógeno como son la glutatión peroxidasa y las peroxirredoxinas.

Por otra parte, también hay que tener en cuenta que el tipo de muestra empleada para medir los niveles de actividad catalasa en nuestro estudio difiere de la empleada en el resto de estudios. Puesto que, en nuestro estudio, empleando plasma seminal, los resultados obtenidos para cantidad y actividad de la enzima son concordantes y en los otros estudios, empleando sangre, no son concordantes, podemos pensar que, en plasma seminal, la enzima expresada se mantiene activa mientras que en sangre podrían existir formas inactivas de la enzima que estarían provocando las diferencias observadas entre cantidad y actividad enzimática.

Los resultados que hemos obtenido al estudiar los niveles de cantidad y actividad catalasa en plasma seminal son también concordantes con los que hemos obtenido al medir los niveles de expresión de dicha enzima en el propio espermatozoide mediante PCR a tiempo real. En este caso se obtuvieron niveles de expresión de la enzima para el genotipo CT aproximadamente 3.5 veces superiores a los obtenidos para el genotipo CC.

Parece por tanto bastante claro que en el polimorfismo CAT C-262T el alelo T supone una variante con mayor nivel de expresión que el alelo salvaje C y que, al menos en plasma seminal, esta mayor expresión se traduce en una mayor cantidad de enzima y una mayor actividad enzimática en los genotipos que incluyen el alelo T, especialmente en el genotipo heterocigoto CT. Concretamente, en base a nuestros resultados podríamos decir que el genotipo heterocigoto CT presenta unos niveles de expresión en torno a 3 veces superiores a los que presenta el genotipo homocigoto CC.

Además, también se ha observado la existencia de una relación entre la actividad de la enzima catalasa en el plasma seminal y los niveles de estrés oxidativo y fragmentación del DNA espermático: muestras con bajos niveles de actividad catalasa en el plasma seminal presentan mayores niveles de estrés oxidativo y como consecuencia mayor porcentaje de fragmentación en el DNA espermático. Estas diferencias son estadísticamente significativas para la actividad de la enzima catalasa en el plasma seminal y los niveles de estrés oxidativo ($P=0.042$).

3) Estudio de los prostasomas como fuente de marcadores de infertilidad

El plasma seminal es rico en vesículas extracelulares tipo exosoma producidas en el epitelio prostático y llamadas por tanto prostasomas. Se ha demostrado que los prostasomas se fusionan con el espermatozoide produciendo un incremento en la motilidad espermática y participando en la capacitación espermática y la reacción acrosomal. Además, también tienen otras propiedades que resultan beneficiosas para la fertilidad como son la capacidad antioxidante, antibacteriana, inmunosupresora y coagulante. Muchas de estas propiedades se deben a la carga proteica presente en los

prostasomas la cual es transferida al espermatozoide tras la fusión. Los prostasomas actuaría por lo tanto como un reservorio que permite la reposición de proteínas en el espermatozoide transcripcionalmente inactivo. En este estudio se ha comparado la carga proteica de prostasomas aislados de muestras normozoospermicas con la de prostasomas aislados de muestras no normozoospermicas y se ha observado que existen diferencias en dicha carga, especialmente en cuanto a niveles de expresión.

3.1) Descripción morfológica de los prostasomas

Primeramente, se compararon, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y mediante análisis de partículas, los aspectos morfológicos de los prostasomas aislados de muestras normozoospermicas y no normozoospermicas. Mediante microscopía electrónica de transmisión se observó que en ambos casos aparecían dos subpoblaciones diferentes: una subpoblación de mayor tamaño y electrodensa y otra de menor tamaño y electrosuave. Esta observación es concordante con la realizada por el grupo de Poliakov *et al.* (241) quienes describieron la presencia de dos subpoblaciones similares en prostasomas aislados del plasma seminal de tres voluntarios sanos. Sin embargo, sí que se observó en los aislados de muestras normozoospermicas mayor concentración de partículas lipídicas y cuerpos multivesiculares que la observada en los aislados de muestras no normozoospermicas. Esto podría indicar que el plasma seminal de muestras normozoospermicas es en términos generales más rico en material que el de muestras no normozoospermicas. Por otra parte, al estudiar los prostasomas mediante análisis de partículas no se observaron diferencias significativas entre los prostasomas aislados de muestras normozoospermicas y los aislados de muestras no normozoospermicas en cuanto a concentración de partículas o diámetros, mostrando los primeros valores ligeramente inferiores.

3.2) Estudio de la carga proteica de los prostasomas

A nivel proteómico, en el conjunto de las 26 muestras incluidas en el estudio se identificaron un total de 1282 proteínas diferentes de las cuales 796 (62%) aparecieron en todas las muestras analizadas. El número de proteínas identificadas en nuestro estudio es superior al número de proteínas identificadas en otros estudios previamente publicados (ver **Tabla 46**). Estas diferencias se pueden explicar en base a dos aspectos: i) la evolución de los sistemas de espectrometría de masas cuya sensibilidad está en continuo aumento permitiendo así detectar cada vez mayor número de proteínas y ii) el número de muestras incluidas en el estudio.

Grupo	Año de publicación/realización	Nº de muestras	Nº de proteínas identificadas	Nº de proteínas comunes con nuestro estudio
Utleg <i>et al.</i> (138)	2003	5	139	105 (9.6%)
Poliakov <i>et al.</i> (241)	2008	3	440	289 (24.8%)
Ronquist <i>et al.</i> (242)	2013	30-40	703	426 (33.8%)
Yang <i>et al.</i> (243)	2017	12	1474	719 (47.9%)
Nuestro estudio	2017	26	1282	

Tabla 46: Tabla resumen de los datos más significativos obtenidos en los estudios de proteómica de prostasomas previamente publicados.

Respecto al número de proteínas comunes a todos los pooles analizadas, nuestro estudio indica que el contenido proteico de los prostasomas es bastante constante en cuanto a la variedad de proteínas que aparecen incluidas en los mismos ya que más de la mitad de las proteínas que se identificaron aparecieron en todas las muestras. Además, al comparar la base de proteínas identificadas en nuestro estudio con las bases de proteínas identificadas en los estudios de Utleg *et al.*, Poliakov *et al.* y Ronquist *et al.* encontramos 53 proteínas que aparecen en todos los estudios (ver **Figura 35 a**). Esta cifra aumentó hasta 366 proteínas al comparar únicamente las bases de proteínas identificadas en nuestro estudio y los de Ronquist *et al.* y Yang *et al.* que son los más similares tanto en año de realización como en número muestral (ver **Figura 35 b**).

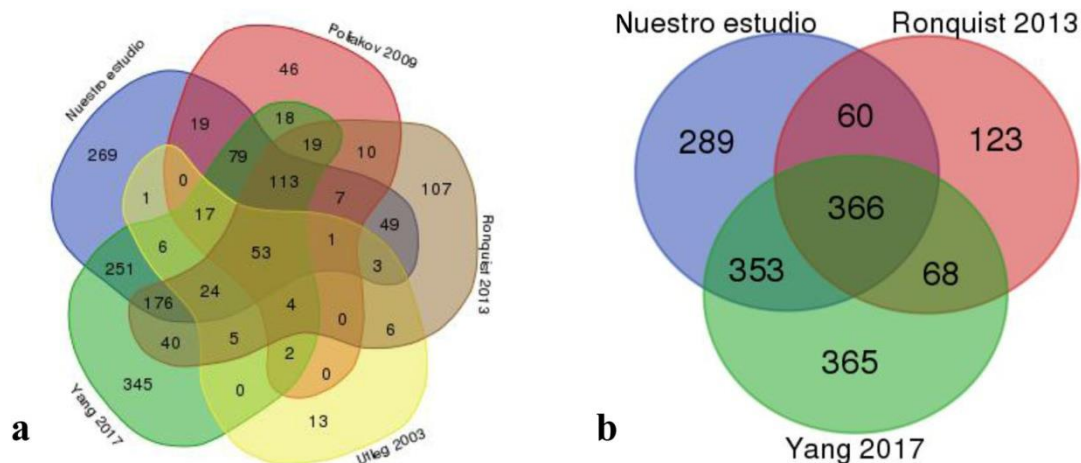


Figura 35: a) Diagrama de Vann para comparar el número de proteínas identificadas en nuestro estudio y en los estudios de Utleg *et al.*, Poliakov *et al.*, Ronquist *et al.* y Yang *et al.*. b) Diagrama de Vann comparando el número de proteínas identificadas entre nuestro estudio los otros dos estudios más recientes (Ronquist *et al.* y Yang *et al.*).

Para explicar las diferencias observadas en cuanto a proteínas comunes a los diferentes estudios podrían emplearse dos argumentos: en parte podrían deberse a variaciones propias de cada muestra y en parte podrían deberse a que únicamente proteínas muy abundantes se podrán identificar de manera consistente en todos los estudios.

Actualmente aún existe cierta controversia entre la comunidad científica respecto a si la carga proteica de los exosomas se selecciona de manera específica o es simplemente un conjunto de proteínas colocadas en los exosomas por azar, aunque la primera opción parece tener más apoyos que la segunda. Nuestras observaciones parecen apoyar también la primera hipótesis ya que resulta bastante improbable que un porcentaje tan elevado de proteínas comunes pueda obtenerse mediante un sistema de carga de los exosomas por azar.

En lo que se refiere al tipo de proteínas identificadas, la mayoría de los grupos de proteínas que aparecen descritos en publicaciones científicas como proteínas presentes en los prostasomas fueron identificados también en nuestro estudio. Esto incluye algunas de las proteínas que se piensa que son exclusivas de prostasomas como son dipeptidil peptidasa I, II y IV, neprilisina, fosfolipasa A1, aminopeptidasa y gamma-glutamyl-transpeptidasa pero también proteínas de otras familias como son las anexinas (1,2,3,4,5,6,7,13), chaperonas (Hsp70 y HSp90), proteínas RAS (RAB, RAP y ARF), proteínas 14-3-3 (α , β , ϵ , ζ , η , θ , σ , γ), kalikreinas... Es interesante resaltar que en un estudio previo el grupo de Ronquist *et al.* (244) identificó 30 proteínas que aparecían en prostasomas de cuatro especies diferentes (humano, perro, caballo y toro) y nosotros pudimos identificar en todas nuestras muestras 29 de esas proteínas. Además, ellos identificaron en prostasomas de humanos 21 proteínas pertenecientes a las rutas glicolíticas (enzimas que participan en la producción de ATP y transportadores de glucosa) y encontraron que 12 de ellas aparecían también en los prostasomas de las otras tres especies; en nuestro estudio hemos identificado 18 de esas proteínas incluyendo las 12 que ellos localizaron en las cuatro especies. Por otra parte, se observan importantes similitudes con los estudios previamente mencionados en cuanto al porcentaje de los principales tipos de proteínas (ver **Figura 36**).

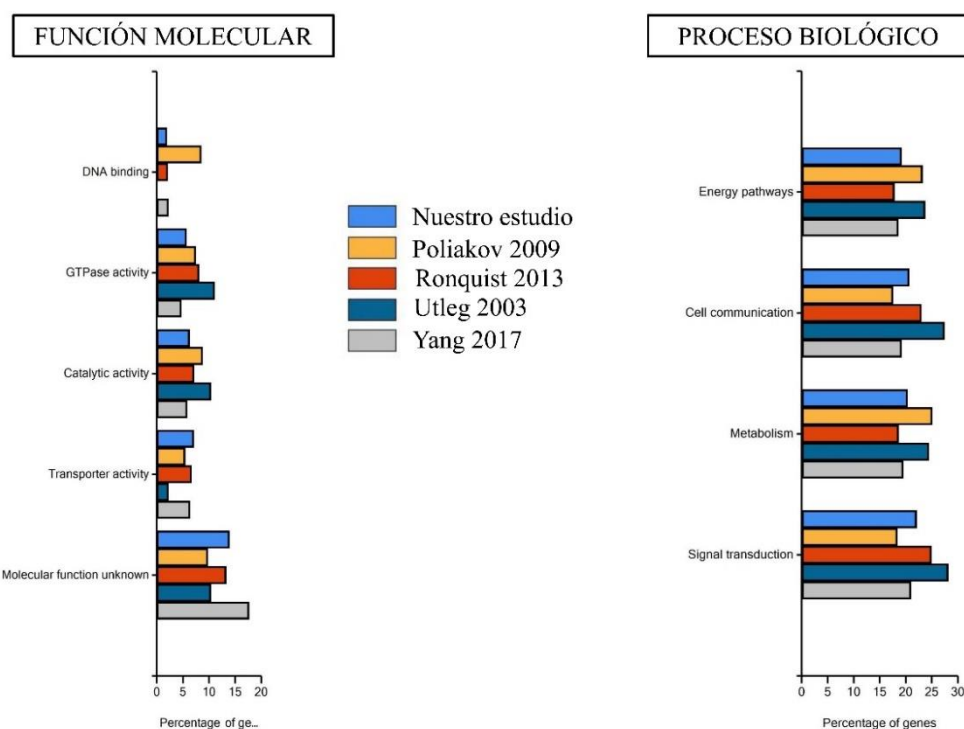


Figura 36: Comparación entre nuestro estudio y los estudios de Utleg *et al.*, Poliakov *et al.*, Ronquist *et al.* y Yang *et al.* en cuanto al porcentaje de los principales tipos de proteínas identificadas.

Al comparar el contenido proteico de los prostasomas aislados de muestras normozoospermicas con el de los prostasomas aislados de muestras no-normozoospermicas únicamente pudimos identificar 5 proteínas que aparecen de modo exclusivo en uno de los dos grupos (proteínas que aparecen en todas las muestras incluidas en un grupo y en ninguna de las del otro grupo). Sin embargo, ninguna de esas proteínas parece tener una implicación relevante en los procesos reproductivos. Por otra parte, ambos grupos muestrales presentan porcentajes de proteínas similares para las dos categorías principales de la clasificación Gene Ontology, función molecular y procesos biológicos. Cabe destacar que las categorías que presentaron la mayor variación entre los dos grupos muestrales en cuanto al porcentaje de proteínas incluidas en las mismas fueron las relacionadas con la motilidad y la adhesión celular las cuales aparecieron incrementadas en los prostasomas aislados de muestras normozoospermicas; esta observación podría resultar importante ya que tanto la motilidad como la adhesión celular son aspectos esenciales para un correcto proceso de fecundación.

Cuando se compararon los niveles de expresión de las proteínas comunes a todas las muestras incluidas en el estudio se encontraron 62 proteínas con variaciones de expresión significativas entre prostasomas aislados de muestras normozoospermicas y prostasomas aislados de muestras no normozoospermicas. De estas proteínas, 7

aparecieron sobreexpresadas en prostasomas aislados de muestras no-normozoospermicas mientras que el resto aparecieron subexpresadas en los mismos.

Entre las proteínas que muestran variación de expresión entre los dos grupos muestrales se incluyen varias proteínas que tienen relación directa con los procesos reproductivos como son la histona H2B tipo 1, la beta-microseminoproteína, la kallikreina 2, la mieloperoxidasa y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). Además, variaciones en la cantidad de estas proteínas presentes en el plasma seminal y/o el espermatozoide han sido previamente relacionadas con la situación de infertilidad masculina:

- Histona H2BA (HISTH2B)

Variante histónica requerida para que se produzca la transición histona-protamina. La HISTH2BA reemplaza a la histona clásica H2B antes de que se inicie la transición histona-protamina dando así lugar a una cromatina más dinámica y facilitando el posterior intercambio de histonas por protaminas. Además, es una de las histonas que se mantienen en el DNA del espermatozoide maduro. Se ha demostrado que el porcentaje de histona H2BA que se mantiene en el espermatozoide maduro es más variable en pacientes infértiles que en donantes fértiles. Además, se ha comprobado que mayores porcentajes de HISTH2BA en el espermatozoide maduro correlacionan con mayor grado de marcaje por cromomicina A3 lo cual indica una menor compactación del DNA y por tanto una mayor susceptibilidad al daño en el DNA por agentes externos (245).

- Beta-microseminoproteína (MSMB, PSP94)

La beta-microseminoproteína es una de las proteínas más abundantes en las secreciones de la próstata. En el espermatozoide maduro se ha localizado en la zona anterior de la cabeza y en el cuello y se piensa que se trata de una proteína periférica que se une al espermatozoide a través de una proteína integral de la membrana. Se ha demostrado que el plasma de pacientes infértiles presenta una concentración de beta-microseminoproteína elevada con respecto al de controles fértiles y que la presencia de beta-microseminoproteína en el medio produce una inhibición significativa de la reacción acrosomal en espermatozoides de cerdo (246).

- Kalikreina (KLK2)

Enzima liberada por la próstata que participa en la licuefacción del plasma seminal. Para ello la kalikreina proteoliza a las seminogelinas (SEMG1 y SEMG2), proteínas liberadas por las vesículas seminales que se unen a la membrana del espermatozoide arrestándolo, impidiendo su movimiento y formando parte del coagulo seminal. Al ser proteolizadas las seminogelinas por la kallikreina los espermatozoides son liberados y el coagulo seminal empieza a deshacerse (247).

- Mieloperoxidasa (MPO)

Enzima fundamental de los neutrófilos que produce HClO a partir de H₂O₂ y Cl₂. En muestra seminal se ha localizado tanto en la fracción celular como en el plasma y se piensa que la parte libre en el plasma haya sido liberada por neutrófilos activados. Se ha correlacionado una concentración elevada de mieloperoxidasa en el plasma seminal con menor concentración espermática y menor motilidad (248).

- Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)

Citoquina proinflamatoria expresada tanto en epidídimo como en próstata y presente en epididimosomas, prostasomas y libre en el plasma seminal (249). La parte liberada por el epidídimo se uniría al espermatozoide en la zona de la cola y regularía la maduración del mismo, manteniendo además la motilidad baja en el tracto masculino para reducir el gasto energético. Esta fracción ha de ser retirada de la superficie del espermatozoide tras la eyaculación para permitir un incremento de la motilidad; se ha demostrado que existe una correlación inversa entre la cantidad de MIF unida al espermatozoide y la motilidad. Por su parte, la fracción de MIF liberada por la próstata quedaría libre en el plasma seminal y participaría en el control de la respuesta inmune vaginal frente al espermatozoide. Se ha observado que existe una correlación diferencial entre la cantidad de MIF presente en el plasma seminal y la calidad espermática de modo que concentraciones medias corresponderían con muestras normozoospermicas, concentraciones bajas con muestras oligozoospermicas y concentraciones altas con muestras astenozoospermicas (250). Además, bajas concentraciones de MIF correlacionan de modo general con una fertilidad reducida.

Por otra parte, dentro de las proteínas que aparecen subexpresadas en prostasomas de muestras no normozoospermicas identificamos 7 proteínas que forman parte de las rutas de producción de energía en el espermatozoide: GLUT3, HK1, LDHC, APRT, AK1, PNP y CMPK1.

Es sabido que el espermatozoide a la hora de suplir sus requerimientos energéticos puede variar entre diversas rutas metabólicas en función de la disponibilidad de oxígeno y sustratos metabólicos en el medio (251). También se sabe que, pese a que la fosforilación oxidativa produce más energía que la glucólisis, el espermatozoide emplea de manera preferente la glucólisis para minimizar la producción de especies reactivas de oxígeno (252), (253). Por otra parte, también se ha demostrado que la glucólisis resulta primordial para la motilidad espermática ya que las mitocondrias, localizadas en la pieza intermedia del espermatozoide, se encuentran demasiado alejadas como para poder suplir el ATP necesario para el batido flagelar; por el contrario, varias enzimas de las rutas glucolíticas, como la hexokinasa I, la GAPDH y la lactato deshidrogenasa C han sido localizadas a lo largo del flagelo unidas a la vaina fibrosa (254). En consecuencia, resulta evidente la importancia que proteínas como el transportador GLUT3 y la enzima hexokinasa 1 tienen para una correcta actividad espermática.

Por su parte, la lactato deshidrogenasa, enzima que cataliza la conversión reversible de piruvato a lactato produciendo a la par NAD^+ necesario para la glucólisis, parece que juega un papel importante en el proceso de capacitación espermática: en el ambiente vaginal, muy rico en piruvato, la LDH produciría grandes cantidades de NAD^+ permitiendo un incremento en la actividad glucolítica necesario para que se inicie el proceso de capacitación (255). De hecho, ratones nulos para la LDHC han resultado tener la fertilidad altamente comprometida, con motilidad espermática reducida y defectos en los procesos de capacitación, reacción acrosomal y unión al óvulo (256). Así mismo, en humanos se ha observado una expresión reducida de la LDHC en pacientes con azoospermia no obstructiva (257) y con motilidad espermática reducida (258).

Otra enzima que también juega un papel importante en la producción de energía por el espermatozoide es la AK1, enzima localizada en el flagelo y que cataliza la producción de ATP usando ADP como sustrato ofreciendo así una fuente extra de ATP (259); se ha demostrado que este aporte extra de ATP mejora el movimiento del flagelo del espermatozoide, logrando unas ondas más lentas pero más fluidas que se propagan a lo largo de todo el flagelo (260).

Cabe destacar que los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas han sido validados mediante western blot para dos de estas enzimas, la LDHC y la HK1, obteniéndose igualmente mayores niveles de expresión en los prostasomas aislados de muestras normozoospermicas que en los prostasomas aislados de muestras no normozoospermicas.

Consecuentemente, pensamos que una reducción en la cantidad de estas enzimas presente tanto en el propio espermatozoide como en el reservorio que suponen los prostasomas podría resultar extremadamente perjudicial para el correcto funcionamiento espermático ya que comprometería la producción de energía en el espermatozoide y en consecuencia la mayoría de los procesos que tienen lugar en el mismo (hiperactivación, capacitación, reacción acrosomal). Ante esto, la determinación de esta situación podría emplearse como biomarcador a la hora de decidir qué tratamiento de reproducción asistida aplicar a cada paciente ya que parece razonable pensar que varones con una reducción en la cantidad de las enzimas de las rutas de producción de energía obtendrán mejores resultados con tratamientos de ICSI, en los que los procesos antes indicados se evitan, que con la FIV clásica.

De acuerdo con los resultados expuestos en esta tesis se puede pensar que en cuanto al tipo de proteínas una parte importante de la carga proteica de los prostasomas es común, independientemente de la calidad de la muestra seminal, como consecuencia de una selección activa de las proteínas que son incorporadas a los prostasomas; las diferencias observadas entre muestras podrían achacarse a pequeñas variaciones específicas de cada muestra sin consecuencias relevantes sobre la fertilidad. Por el contrario, parece que las variaciones en los niveles de dichas proteínas comunes a todas las muestras de

prostasomas podrían tener importancia biológica y estar relacionadas con la calidad de la muestra seminal. Específicamente, parece que los prostasomas presentes en el plasma seminal de varones no normozoospermicos presentarían un patrón de subexpresión proteica en comparación con los presentes en el plasma seminal de varones normozoospermicos; además, dentro de las proteínas cuyos niveles aparecen reducidos en los prostasomas presentes en el plasma seminal de varones no normozoospermicos figuran proteínas de gran importancia para la actividad del espermatozoide, especialmente proteínas implicadas en las rutas de producción de energía en el espermatozoide.

Varios estudios han demostrado que los prostasomas requieren de un pH ácido para poder fusionarse con los espermatozoides lo cual implica que esta fusión ha de tener lugar en el ambiente ácido del tracto reproductivo femenino (144). Partiendo de esta situación podemos afirmar que los prostasomas presentes en los eyaculados seminales analizados no habrán tenido aún un efecto relevante sobre la calidad espermática de dichos eyaculados (de hecho, si estamos aislando los prostasomas es porque aún no se han fusionado con los espermatozoides). Esto nos lleva a plantear que las variaciones observadas en los niveles de proteínas presentes en los prostasomas de eyaculados normozoospermicos y no normozoospermicos podrían ser un reflejo del estado general del aparato reproductivo masculino. De acuerdo con esta idea varones con un estado reproductivo defectuoso presentarían muestras seminales no normozoospermicas y patrones de subexpresión en la carga proteica de sus prostasomas.

Si aceptamos la idea de que las variaciones observadas en los niveles de proteínas presentes en los prostasomas de eyaculados normozoospermicos y no normozoospermicos podrían ser un reflejo del estado general del aparato reproductivo masculino, podemos suponer que hay bastantes probabilidades de que al menos parte de las proteínas que aparecen sobreexpresadas o subexpresadas en los prostasomas dependiendo de la calidad de la muestra seminal aparezcan también sobreexpresadas o subexpresadas en los espermatozoides y el plasma seminal correspondientes. Efectivamente, existen varios estudios publicados que parecen corroborar esta idea. Así, algunas de las proteínas identificadas en este estudio por presentar variaciones de nivel en prostasomas de varones normozoospermicos vs no normozoospermicos ya habían sido identificadas previamente por el grupo de Legare *et al.* por aparecer expresadas de manera diferencial en espermatozoides de varones infértiles en comparación con los de varones fértiles (261): la histona H2B tipo I aparecía sobreexpresada en espermatozoides de pacientes con fallo de IVF mientras que la lactato deshidrogenasa y la proteína epididimal de unión al espermatozoide aparecían subexpresadas en espermatozoides de pacientes infértiles. También algunas de las proteínas que hemos identificado por su expresión diferencial en prostasomas de varones normozoospermicos vs no normozoospermicos, como la beta-microseminoproteína o la el factor inhibitorio de migración de macrófagos, han sido previamente descritas en

publicaciones científicas por presentar diferentes niveles de expresión en plasma de varones normozoospermicos y no normozoospermicos.

Por otra parte, también hay que considerar una segunda consecuencia para ese aparente equilibrio entre la calidad seminal y la calidad de los prostasomas: este equilibrio implicaría que prostasomas de baja calidad se fusionarán con espermatozoides de baja calidad con lo que difícilmente se logrará una mejoría notable en la calidad espermática gracias a los prostasomas.

Finalmente, cabe recordar que la infertilidad masculina ha sido propuesta en varias ocasiones como un indicador de la presencia de defectos en el funcionamiento del aparato reproductor masculino y un precursor de la aparición de cánceres en dicho aparato (262), (263). En línea con esta suposición, aunque este estudio se ha centrado en buscar biomarcadores de infertilidad masculina, hay que mencionar que hemos observado que algunas de las proteínas que hemos identificado por tener presencia diferencial en prostasomas de varones normozoospermicos y no normozoospermicos han sido propuestas previamente en la literatura como biomarcadores de cáncer de próstata (por ejemplo la beta-microseminoproteína, la glutamato carboxipeptidasa 2, las kalikreinas o las prosaposinas) (264), (265).

En conclusión, parece que la carga proteica de los prostasomas podría suponer una excelente fuente de biomarcadores del estado del tracto reproductivo masculino que podrían ser empleados en un futuro como biomarcadores de fertilidad y como biomarcadores para una detección precoz de enfermedades de próstata. No obstante, para que estos biomarcadores puedan implantarse en clínica de manera rutinaria, resulta necesario que nuevos métodos de aislamiento de prostasomas más simples, rápidos y económicos pero no por ello menos eficaces sean desarrollados.

3.3) Estudio del contenido de DNA de los prostasomas

Actualmente existen muy pocos trabajos publicados en que se haya estudiado la presencia de DNA en los prostasomas y los que existen han sido realizados todos por el grupo de Ronquist *et al.* En su primer trabajo, realizado en el año 1990, demostraron la presencia de DNA en los prostasomas, obteniendo una concentración del mismo de 20 ng/μL y un rango de fragmentos de 200 a 20000 pb (266). Posteriormente han mapeado ese DNA en 2 trabajos diferentes concluyendo que contiene secuencias distribuidas al azar en todos los cromosomas, sin preferencia aparente por ninguno en especial, pero si con una cierta preferencia hacia secuencias codificantes para genes (267), (268). En concreto, los únicos cromosomas para los que no han encontrado secuencias en los prostasomas son los cromosomas 4, 5, 7, 18, 22 y el cromosoma Y. Además, también han demostrado que ese DNA se transfiere a los espermatozoides a pH 5.5 que es precisamente el pH fisiológico de la vagina (269).

Los resultados que se han obtenido en el estudio preliminar incluido en esta tesis concuerdan en muchos aspectos con los resultados obtenidos por el grupo de Ronquist

et al. Así, nosotros también hemos obtenido concentraciones de DNA de en torno a 20 ng/ μ L, algo inferiores en el caso de los prostasomas aislados de muestras normozoospermicas, y rangos de fragmentos y perfiles de BioAnalyzer similares a los suyos. Sin embargo, a diferencia de ellos, nosotros sí hemos obtenido secuencias que mapean para todos los cromosomas, incluidos los cromosomas sexuales. Es posible que esta diferencia se deba al número de muestras seminales incluidas en los estudios, el cual ellos no indican. En cualquier caso, los porcentajes de mapeo obtenidos, en torno al 3% en todos los casos, refuerzan la idea propuesta por Ronquist *et al.* de que se trate de secuencias de DNA incorporadas en los prostasomas al azar sin especial preferencia por ningún cromosoma.

Al comparar la cobertura de secuencias entre prostasomas aislados a partir de muestras normozoospermicas y no normozoospermicas no se han encontrado diferencias para ningún cromosoma. Para todos los cromosomas se encontraron en ambos grupos de prostasomas coberturas de en torno al 3% excepto para el X cuya cobertura fue del 1.5%. Curiosamente, sí que se han encontrado diferencias para el DNA mitocondrial para el cual la cobertura de mapeo es un 10% inferior en el caso de los prostasomas aislados a partir de muestras no normozoospermicas (41.16% vs 49.88%). Aunque el grupo de Ronquist *et al.* no detectó la presencia de DNA mitocondrial en los prostasomas sí que existe al menos otro estudio, realizado por el grupo de Guescini *et al.*, en el que se identificó la presencia de DNA mitocondrial en exosomas, en concreto en exosomas liberados por astrocitos y células de la glía, proponiendo que esta podría ser una vía de entrada en las células de DNA mitocondrial defectuoso (270).

En nuestro caso, puesto que las mitocondrias son los principales centros de producción de energía a nivel celular, esta observación podría enlazar con los resultados obtenidos a nivel de la carga de proteínas de los prostasomas, los cuales mostraban patrones de subexpresión para varias proteínas que forman parte de las rutas de producción de energía en el espermatozoide. Ambos hechos estarían indicando que los prostasomas presentes en el plasma seminal de pacientes no normozoospermicas presentan una situación de deficiencia para aquellos componentes relacionados con la producción de energía.

4) Discusión general

La infertilidad, definida por la OMS como la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas, es un problema que en países desarrollados afecta a un 14% de las parejas. Hasta ahora el abordaje del varón infértil se ha centrado fundamentalmente en el análisis del seminograma el cual comprende principalmente tres parámetros: concentración espermática, motilidad y morfología. Sin embargo, cada vez más estudios apuntan a la necesidad de actualizar este abordaje incluyendo nuevos biomarcadores moleculares de infertilidad masculina más específicos y más adecuados a la evolución actual tanto de la infertilidad masculina propiamente dicha como de las técnicas de reproducción asistida. La mejora y

actualización del seminograma tradicional permitiría realizar un diagnóstico más ajustado de las causas que se encuentran detrás de la aparición de una situación de infertilidad en el varón lo cual a su vez permitiría una mejor selección del tratamiento más adecuado para cada paciente, incrementándose las tasas de embarazo y reduciéndose los costes para los pacientes, tanto económicos como psicológicos.

En esta tesis se han estudiado varios aspectos relacionados con los procesos reproductivos como fuente potencial de biomarcadores de infertilidad masculina. En un primer bloque se ha analizado la presencia de polimorfismos tipo SNP en genes codificantes para enzimas de reparación del DNA y enzimas antioxidantes como fuente de biomarcadores genéticos de infertilidad, marcadores que podrían ser muy útiles debido a que permanecen invariables a lo largo de toda la vida del individuo. En un segundo bloque se han estudiado los prostasomas presentes en el plasma seminal como fuente de biomarcadores de infertilidad masculina, con especial interés sobre la carga proteica de los mismos, la cual podría ser un excelente candidato a biomarcador por estar protegida frente a la degradación causada por agentes externos.

En las dos aproximaciones en las que se ha trabajado se han podido identificar potenciales biomarcadores de infertilidad masculina. Por una parte, el polimorfismo CAT C-262T, localizado en el gen de la enzima catalasa, parece mostrar una importante asociación con la infertilidad masculina. El genotipo CT presentaría niveles de actividad catalasa en plasma seminal y de expresión en el espermatozoide en torno a 3 veces superiores al genotipo CC y se asociaría con un efecto protector del mismo frente a la aparición de infertilidad masculina. Por otra parte, se han podido identificar 54 proteínas que muestran patrones de subexpresión en prostasomas aislados a partir de plasma seminal de varones no normozoospermicos en comparación con prostasomas aislados a partir de plasma seminal de varones normozoospermicos, incluyendo tanto varias proteínas directamente relacionadas con los procesos reproductivos como 7 enzimas involucradas en las rutas de producción de energía en el espermatozoide. De estas últimas, 2, la LDHC y la HK1, han sido validadas con éxito mediante western blot, comprobándose que sus niveles de expresión son efectivamente inferiores en prostasomas aislados a partir de plasma seminal de varones no normozoospermicos.

Por lo tanto consideramos que estos dos biomarcadores identificados en este trabajo podrían ser buenos candidatos para complementar en un futuro el seminograma clásico aunque para llegar a ese punto sería necesario por una parte validar nuestros resultados en poblaciones muestrales mayores y por otro desarrollar sistemas más rápidos de evaluación de estos polimorfismos que puedan ser incorporados en el trabajo rutinario de una clínica de infertilidad. Este segundo requisito parece bastante fácil de solventar en el caso los polimorfismos genéticos los cuales se podrían incluir con relativa facilidad en futuros chips de detección de marcadores genéticos de infertilidad del estilo de los que recientemente han empezado a comercializarse para la detección de marcadores genéticos de enfermedades hereditarias. Por el contrario, para poder incluir

en el ámbito clínico marcadores de infertilidad presentes en los prostasomas será necesario que previamente se desarrollen sistemas generales de aislamiento de exosomas más rápidos y que requieran de un aparataje más sencillo ya que parece poco probable que las clínicas de infertilidad puedan incluir en su rutina el aislamiento de prostasomas mediante procedimientos de ultracentrifugación que requieren de tiempos de trabajo de varias horas.

CONCLUSIONES

A) Respecto a los biomarcadores a nivel genético

1. Para el polimorfismo XRCC1 Arg399Gln el genotipo Arg/Arg se asoció con un aumento de la probabilidad de presentar infertilidad (OR = 2.223, IC 95%=1,296-3.813; P=0.003) y el heterocigoto Arg/Gln mostró un efecto protector frente a la infertilidad (OR =0.555; IC 95%=0.337-0.912; P=0.019)
2. Para el SNP CAT C-262T el genotipo CC se relacionó con un aumento de la probabilidad de presentar infertilidad (OR = 2.262, IC 95% = 1.369 - 3.733; P = 0.001) mientras que el genotipo CT se asoció con un efecto protector (OR = 0.401; IC 95% = 0.241 - 0.667; P = 0.001).
3. Funcionalmente, el alelo T del polimorfismo CAT C-262T supone una variante con mayor nivel de expresión que el alelo salvaje C y, al menos en plasma seminal, esta mayor expresión se traduce en una mayor cantidad de enzima y una mayor actividad enzimática en los genotipos que incluyen el alelo T, especialmente en el genotipo heterocigoto CT el cual muestra niveles de actividad en torno a 3 veces superiores a los mostrados por el genotipo CC. Es por ello que el alelo C se asocia con una mayor incidencia de infertilidad masculina.
4. Para el resto de polimorfismos incluidos en esta tesis localizados en genes codificantes para enzimas antioxidantes y de reparación se han encontrado correlaciones interesantes, aunque no estadísticamente significativas, que permiten proponer que los varones con los alelos Ser para el polimorfismo OGG1 Ser326Cys, Val para el SNP SOD2rs4880, Leu para el SNP GPX1Pro200Leu y variantes salvajes para las GSTs tendrán mejores características seminales.
5. El empleo de marcadores genéticos de infertilidad como complemento del seminograma clásico podría aportar información que permita por una parte un conocimiento más exacto de las causas que están produciendo la situación de infertilidad y por otra una mejor selección del tratamiento a aplicar.

B) Respecto a los biomarcadores a nivel prostasómico

1. Los prostasomas obtenidos a partir del plasma seminal de varones normozoospermicos presentan valores ligeramente inferiores tanto para la concentración de partículas como para el diámetro medio respecto a los prostasomas obtenidos a partir del plasma seminal de varones no normozoospermicos (2.47E+12/mL vs 4.02E+12/mL y 143nm vs 148 nm respectivamente)
2. Se detectaron un total de 1282 proteínas presentes en los prostasomas de las cuales un 62% aparecieron en todos los pools de prostasomas, independientemente de la calidad de la muestra seminal de la que procedieran.

3. Los prostasomas presentes en el plasma seminal de varones no normozoospermicos presentan un patrón de subexpresión proteica en comparación con los presentes en el plasma seminal de varones normozoospermicos.
4. Se han detectado 54 proteínas cuyos niveles aparecen reducidos en prostasomas de muestras no normozoospermicas, incluyéndose proteínas de gran importancia para la actividad del espermatozoide, especialmente 7 proteínas implicadas en las rutas de producción de energía en el espermatozoide (LDHC, GLUT3, HK1, APRT, AK1, PNP y CMPK1).
5. Se han validado los niveles de expresión de las enzimas HK1 y LDHC en prostasomas obteniéndose unos niveles de expresión un 25% y 50% inferiores respectivamente en prostasomas presentes en el plasma seminal de varones no normozoospermicos en comparación con prostasomas presentes en el plasma seminal de varones normozoospermicos.
6. Las variaciones observadas en los niveles de proteínas presentes en los prostasomas de eyaculados normozoospermicos y no normozoospermicos podrían ser un reflejo del estado general del aparato reproductivo masculino y tener por tanto importancia biológica, estando relacionadas con la calidad de la muestra seminal.
7. La carga proteica de los prostasomas podría suponer una excelente fuente de biomarcadores del estado del tracto reproductivo masculino pudiendo ser empleados como biomarcadores de fertilidad en un futuro siempre y cuando se desarrollen métodos de aislamiento de prostasomas más sencillos de aplicar de modo rutinario.

CONCLUSIONS

A) For the genetic biomarkers

1. For SNP XRCC1 Arg399Gln, the Arg/Arg (OR = 2.223, IC 95%=1,296-3.813; P=0.003) genotype was associated with an increased risk of male infertility while the Arg/Gln genotype was associated with a protective effect against infertility (OR =0.555; IC 95%=0.033-0.912; P=0.019).
2. For SNP CAT C-262T, the CC genotype was associated with an increased risk of male infertility (OR = 2.262, IC 95% = 1.369 - 3.733; P = 0.001) while the CT genotype was associated with a protective effect against infertility (OR = 0.401; IC 95% = 0.241 - 0.667; P = 0.001).
3. Functionally, the T allele for CAT C-262T polymorphism is a variant with higher expression levels than the C allele and, at least in seminal plasma, it correlates with higher concentrations of the enzyme as well as higher activity levels, especially for the heterozygote CT genotype, which correlates with 3 times higher activity levels than the CC genotype. Consequently, the C allele correlates with higher incidence of male infertility.
4. For the rest of the polymorphisms included in this thesis we have found interesting correlations with male infertility, although none of those correlations were statistically significant. Thus, we propose that males having the alleles Ser for polymorphism OGG1, Ser326Cys Val for SNP SOD2rs4880, Leu for SNP GPX1 Pro200Leu and wild variants for the GSTs should show better seminal characteristics.
5. Complementing the traditional seminogram with the use of genetic markers should allow a more precise knowledge of the causes underlying male infertility as well as more efficient selection of the infertility treatment.

B) For the prostasomal biomarkers

1. Prostatosomes isolated from normozoospermic seminal samples show slightly lower values for both particle concentration and medium diameter than prostatosomes isolated from normozoospermic seminal samples (2.47E+12/mL vs 4.02E+12/mL y 143nm vs 148 nm respectively).
2. 1282 different proteins were detected in our prostasomal isolated being more than a 50% of them present in all prostasomal pools, independently of the quality of the ejaculate
3. Prostatosomes from non normozoospermic males' ejaculates show a pattern of protein underexpression when compared with prostatosomes from normozoospermic males' ejaculates.
4. 54 proteins underexpressed in prostatosomes from non normozoospermic males' ejaculates have been identified, including proteins with known relevant implications in

sperm function and fertility as well as 7 proteins from the sperm energy production pathways (LDHC, GLUT3, HK1, APRT, AK1, PNP y CMPK1).

5. Expression levels of enzymes HK1 and LDHC have been validated in prostasomes. 25% lower levels for HK1 and 50% lower levels for LDHC have been observed in prostasomes isolated from non normozoospermic seminal samples when compared with prostasomes isolated from normozoospermic seminal samples.

6. The observed variations in the levels of the prostasomal proteins between prostasomes from normozoospermic and non normozoospermic ejaculates may be a reflection of the general status of the male reproductive system thus being related with the quality of the ejaculate.

7. Prostrasomal proteomic cargo could be an excellent source of biomarkers for the status of the male reproductive system and thus could be used as biomarkers of male infertility providing handier prostrasome isolation methods are developed.

BIBLIOGRAFÍA

References

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, *et al.* International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and Sterility*. 2009;92(5):1520-4.
2. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte M. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology And Endocrinology*. 2015;13(1):37.
3. Matorras R HJ. Estudio y tratamiento de la pareja esteril: recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad. Adalia; 2007.
4. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5° ed. ; 2010.
5. Stokes-Riner A, Thurston SW, Brazil C, Guzick D, Liu F, Overstreet JW, *et al.* One semen sample or 2? Insights from a study of fertile men. *Journal of Andrology*. 2007;28(5):638.
6. Franken DR, Oehninger S. Semen analysis and sperm function testing. *Asian Journal of Andrology*. 2012;14(1):6-13.
7. Remohi J, Cobo A, Romero J, de los Santos MJ, Pellicer A. Manual práctico de esterilidad y reproducción asistida: laboratorio de reproducción asistida. 3° ed. McGraw-Hill; 2007.
8. Holt WV. Is quality assurance in semen analysis still really necessary? *Reproductive Health Matters*. 2006;14(28):221.
9. Holt WV. Is quality assurance in semen analysis still really necessary? A spermatologist's viewpoint. *Human Reproduction*. 2005;20(11):2983-6.
10. De Jonge C. Semen analysis: looking for an upgrade in class. *Fertility and Sterility*. 2012;97(2):260-66.
11. Barratt C, Mansell S, Beaton C, Tardif S, Oxenham S. Diagnostic tools in male infertility--the question of sperm dysfunction. *Asian Journal of Andrology*. 2011;13(1):53-8.
12. Brugh III VM, Lipshultz LI. Male factor infertility: Evaluation and management. *Medical Clinics of North America*. 2004;88(2):367-85.

13. Tomar AK, Sooch BS, Singh S, Yadav S. Differential proteomics of human seminal plasma: A potential target for searching male infertility marker proteins. *Proteomics - Clinical Applications*. 2012;6(3-4):147-51.
14. Ombelet W, Bosnians E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, *et al*. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: A need for change in the interpretation of semen testing. *Human Reproduction*. 1997;12(5):987-93.
15. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, *et al*. Sperm Morphology, Motility, and Concentration in Fertile and Infertile Men. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(19):1388-93.
16. van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC, F. Habbema JD, Hompes PGA, Kremer JAM, *et al*. Role of semen analysis in subfertile couples. *Fertility and Sterility*. 2011;95(3):1013-9.
17. Van Der Merwe FH, Kruger TF, Oehninger SC, Lombard CJ. The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2005;59(2):86-91.
18. Alvarez C, Castilla JA, Martínez L, Ramírez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Human Reproduction*. 2003;18(10):2082-8.
19. Castilla JA, Alvarez C, Aguilar J, González-Varea C, Gonzalvo MC, Martínez L. Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. *Human Reproduction*. 2006;21(4):847-51.
20. Lewis SEM. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction*. 2007;134(1):31.
21. Lo Monte G, Murisier F, Piva I, Germond M, Marci R. Focus on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a mini-review. *Asian Journal of Andrology*. 2013;15(5):608-15.
22. Antinori S, Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, *et al*. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reproductive BioMedicine Online*. 2008;16(6):835-41.
23. Wilding M, Coppola G, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B. Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *Journal of Assisted Reproductive Genetics*. 2011;28(3):253-62.

24. Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *International Journal of Andrology*. 2006;29(1):69-75.
25. Pacey AA. Assessment of male factor. Best practice & research. *Clinical obstetrics & gynaecology*. 2012;26(6):739.
26. Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y, Pasic M, Yousef G. Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Molecular Cancer*. 2017;16(1):80.
27. Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, Pellicer A, de los Santos MJ, *et al*. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*. 2006;85(2):371-83.
28. Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian Journal of Andrology*. 2004;6(2):139-48.
29. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SEM. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Human Reproduction*. 2010;25(7):1594-608.
30. González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(11):14026-52.
31. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility*. 2010;93(4):1027-36.
32. Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal of Andrology*. 2009;32(1):46-56.
33. Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human Reproduction Update*. 2007;13(3):313-27.
34. Oliva R. Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*. 2006 JUL-AUG 2006;12(4):417-35.
35. Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, *et al*. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertility and Sterility*. 2006;86(5):1408-15.
36. Carrell DT, Liu LH. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *Journal of Andrology*. 2001;22(4):604-10.

37. de Mateo S, Gazquez C, Guimera M, Balasch J, Meistrich ML, Luis Ballesca J, *et al.* Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertility and Sterility*. 2009;91(3):715-22.
38. Torregrosa N, Dominguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballesca JL, *et al.* Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Human Reproduction*. 2006;21(8):2084-9.
39. Sakkas D, Seli E, Manicardi GC, Nijs M, Ombelet W, Bizzaro D. The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? *Human fertility*. 2004;7(2):99.
40. Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di Benedetto D, De Palma A, *et al.* Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-asthenoteratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Human Reproduction*. 2004;19(10):2298-302.
41. Sakkas D, Mariethoz E, St. John JC. Abnormal Sperm Parameters in Humans Are Indicative of an Abortive Apoptotic Mechanism Linked to the Fas-Mediated Pathway. *Experimental Cell Research*. 1999;251(2):350-5.
42. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 2000;15(6):1338-44.
43. Alshahrani S, Agarwal A, Assidi M, Abuzenadah AM, Durairajanayagam D, Ayaz A, *et al.* Infertile men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage. *Reproductive biology and endocrinology*. 2014;12(1):103-.
44. Bojar I, Witczak M, Wdowiak A. Biological and environmental conditionings for a sperm DNA fragmentation. *Annals of Agricolar and Environmental Medicine*. 2013;20(4):865.
45. Das M, Al-Hathal N, San-Gabriel M, Phillips S, Kadoch I, Bissonnette F, *et al.* High prevalence of isolated sperm DNA damage in infertile men with advanced paternal age. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2013;30(6):843-8.
46. Vagnini L, Baruffi R, Mauri A, Petersen C, Massaro F, Pontes A, *et al.* The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reproductive BioMedicine Online*. 2007;15(5):514-9.

47. Agarwal A, Gupta S, Du Plessis S, Sharma R, Esteves SC, Cirenza C, *et al.* Abstinence Time and Its Impact on Basic and Advanced Semen Parameters. *Urology*. 2016;94:102-10.
48. Gosálvez J, González-Martínez M, López-Fernández C, Fernández JL, Sánchez-Martín P. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertility and Sterility*. 2011;96(5):1083-6.
49. Gosálvez J, Núñez R, Fernández JL, López-Fernández C, Caballero P. Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and gradient processed ejaculates in human donors: Dynamics of sperm DNA damage. *Andrologia*. 2011;43(6):373-7.
50. Agarwal A, Said T, Bedaiwy M, Banerjee J, Alvarez J. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertility and sterility*. 2006;86:503-12.
51. Simonenko EY, Garmaeva SB, Yakovenko SA, Grigorieva AA, Tverdislov VA, Mironova AG, *et al.* The influence of the storage temperature and cryopreservation conditions on the extent of human sperm DNA fragmentation. *Biophysics*. 2016;61(2):267-70.
52. Cabler S, Agarwal A, Flint M, du Plessis SS. Obesity: modern man's fertility nemesis. *Asian Journal of Andrology*. 2010;12(4):480-9.
53. Gibbon C. Varicocele e infertilidad masculina. In: Lerner J, Urbina M, editors. *Fertilidad y reproducción asistida*. 1st ed. Caracas: Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 201-5.
54. Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, Fernández JL, López-Fernández C, Aragón-Tovar AR, Urbina-Bernal LC, *et al.* DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele evaluated by sperm chromatin dispersion and DBD-FISH. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2016;293(1):189-96.
55. Enciso M, Muriel L, Fernández JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, *et al.* Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *Journal of Andrology*. 2006;27(1):106-11.
56. Talebi AR, Moein MR, Tabibnejad N, Ghasemzadeh J. Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia*. 2008;40(4):245-51.

57. Ahmadipanah M, Hosseinifar H, Sabbaghian M, Moazenchi M, Yazdi RS, Gilani MS, *et al.* Chlamydia Trachomatis Can Increase Sperm DNA Fragmentation in Infertile Men. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2013;7:123.
58. Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertility and Sterility*. 2008;90(2):328-34.
59. De Palma A, Vicari E, Palermo I, D'Agata R, Calogero AE. Effects of cancer and anti-neoplastic treatment on the human testicular function. *Journal of Endocrinology Investigation*. 2000;23(10):690-6.
60. Mann T, Lutwak-Mann C. Passage of chemicals into human and animal semen: mechanisms and significance. *Critical Reviews on Toxicology*. 1982;11(1):1.
61. Lampiao F, Opperman CJ, Agarwal A, du Plessis SS. Oxidative Stress. In: *Male Infertility*. New York, NY: Springer New York; 2012. p. 225-35.
62. Junqueira V, Barros S, Chan S, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud R. Aging and oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine*. 2004;25:5-16.
63. Weir CP, Robaire B. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat. *Journal of Andrology*. 2007;28(2):229.
64. Aitken R, Smith T, Jobling M, Baker M, de Lullis N. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*. 2014;16(1):31-8.
65. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas J, A J., Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *Journal of Andrology*. 2001;22(4):575.
66. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian Journal of Andrology*. 2004;6(1):59.
67. Moein MR, Soleimani M, Tabibnejad N. Reactive oxygen species (ROS) production in seminal fluid correlate with the severity of varicocele in infertile men. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2009;6(2).
68. Allamaneni SSR, Naughton CK, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A. Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. *Fertility and Sterility*. 2004;82(6):1684-6.

69. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*. 2006;12(5):630-3.
70. Agarwal A, Deepinder F, Sharma RK, Ranga G, Li J. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertility and Sterility*. 2008;89(1):124-8.
71. De Iuliis GN, Newey RJ, King BV, Aitken RJ. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PloS one*. 2009;4(7):e6446.
72. Aitken RJ, Bennets LE, Sawyer D, Wiklend AM, King BV. Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *International Journal of Andrology*. 2005;28(3):171-9.
73. Aydemir B, Kiziler AR, Onaran I, Alici B, Ozkara H, Akyolcu MC. Impact of Cu and Fe concentrations on oxidative damage in male infertility. *Biological Trace Element Research*. 2006;112(3):193-203.
74. Jurasović J, Cvitković P, Pizent A, Čolak B, Telišman S. Semen quality and reproductive endocrine function with regard to blood cadmium in Croatian male subjects. *Biometals*. 2004;17(6):735-43.
75. Pant N, Shukla Y, Shukla M, Kumar Patel D, Mathur N, Kumar Gupta Y, *et al*. Correlation of phthalate exposures with semen quality. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008;231(1):112-6.
76. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility*. 2002;78(3):491-9.
77. Kiziler AR, Aydemir B, Onaran I, Alici B, Ozkara H, Gulyasar T, *et al*. High Levels of Cadmium and Lead in Seminal Fluid and Blood of Smoking Men are Associated with High Oxidative Stress and Damage in Infertile Subjects. *Biological Trace Elements Research*. 2007;120(1):82-91.
78. Tartibian B, Maleki BH. Correlation between seminal oxidative stress biomarkers and antioxidants with sperm DNA damage in elite athletes and recreationally active men. *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*. 2012;22(2):132.

79. Fenster L, Katz DF, Wyrobek AJ, Pieper C, Rempel DM, Oman D, *et al.* Effects of psychological stress on human semen quality. *Journal of Andrology*. 1997;18(2):194.
80. Radwan M, Jurewicz J, Merecz-Kot D, Sobala W, Radwan P, Bochenek M, *et al.* Sperm DNA damage-the effect of stress and everyday life factors. *International Journal of Impotence Research*. 2016;28(4):148.
81. Eskiocak S, Gozen AS, Kilic AS, Molla S. Association between mental stress & some antioxidant enzymes of seminal plasma. *Indian Journal of Medical Research*. 2005;122(6):491.
82. Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*. 1999;5(5):399.
83. Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, *et al.* Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Human Reproduction*. 2007;22(7):1871.
84. Pergialiotis V, Prodromidou A, Frountzas M, Korou LM, Vlachos GD, Perrea D. Diabetes mellitus and functional sperm characteristics: A meta-analysis of observational studies. *Journal of Diabetes Complications*. 2016;30(6):1167-76.
85. Kashou A, du Plessis S, Agarwal A. The role of obesity in ROS generation and male infertility. In: Agarwal A, Aitken R, Alvarez JG, editors. *Studies on Men's Health and Fertility*. Springer; 2012. p. 571-90.
86. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *The World Journal of Men's Health*. 2014;32(1):1-17.
87. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2008;59(1):2-11.
88. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2010;48(5):425.
89. O'Flaherty C. The enzymatic antioxidant system of human spermatozoa. *Advances in andrology*. 2014;2014:1-15.
90. Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Słowikowska-Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European Journal of Urology*. 2013;66(1):60.

91. Yan L, Liu J, Wu S, Zhang S, Ji G, Gu A. Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2014;31(5):549-54.
92. Alvarez JG, Storey BT. Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 1984;30(4):833-41.
93. Peeker R, Abramsson L, Marklund SL. Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. 1997;3(12):1061.
94. Zini A, Garrels K, Phang D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology*. 2000;55(6):922-6.
95. Aitken RJ, Buckingham DW, Carreras A, Stewart Irvine D. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: Relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996;21(4):495-504.
96. Tefik T, Kucukgergin C, Sanli O, Oktar T, Seckin S, Ozsoy C. Manganese superoxide dismutase Ile58Thr, catalase C-262T and myeloperoxidase G-463A gene polymorphisms in patients with prostate cancer: relation to advanced and metastatic disease. *BJU Int*. 2013;112(4):E406-14.
97. Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research*. 1989;24(2):185-96.
98. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 1993;16(3):183.
99. Zelen I, Mitrović M, Jurisic-Skevin A, Arsenijević S. Activity of superoxide dismutase and catalase and content of malondialdehyde in seminal plasma of infertile patients. *Medizinski Pregled*. 2010;63(9-10):624-9.
100. Moubasher AE, El Din AME, Ali ME, El-sherif WT, Gaber HD. Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Andrologia*. 2013;45(2):135-9.
101. Suzen HS, Gucyener E, Sakalli O, Uckun Z, Kose G, Ustel D, et al. CAT C-262T and GPX1 Pro198Leu polymorphisms in a Turkish population. *Molecular Biology Reports*. 2010;37(1):87-92.

102. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(44):27812-7.
103. Vignini A, Nanetti L, Buldreggini E, Moroni C, Ricciardo-Lamonica G, Mantero F, *et al.* The production of peroxynitrite by human spermatozoa may affect sperm motility through the formation of protein nitrotyrosine. *Fertility and Sterility*. 2006;85(4):947-53.
104. Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *The FEBS journal*. 2007;274(9):2163-80.
105. Garrido N, Meseguer M, Alvarez J, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*. 2004;82:1059-66.
106. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, *et al.* Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation. *Science*. 1999;285(5432):1393-6.
107. Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kölle S, Roveri A, *et al.* The Nuclear Form of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Is a Protein Thiol Peroxidase Contributing to Sperm Chromatin Stability. *Molecular Cell Biology*. 2005;25(17):7637-44.
108. Olshan AF, Luben TJ, Hanley NM, Perreault SD, Chan RL, Herring AH, *et al.* Preliminary examination of polymorphisms of GSTM1, GSTT1, and GSTZ1 in relation to semen quality. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2010;688(1-2):41-6.
109. Gopalakrishnan B, Aravinda S, Pawshe CH, Totey SM, Nagpal S, Salunke DM, *et al.* Studies on glutathione S-transferases important for sperm function: evidence of catalytic activity-independent functions. *Biochemical Journal*. 1998;329 (Pt 2)(Pt 2):231-41.
110. Hemachand T, Gopalakrishnan B, Salunke DM, Totey SM, Shaha C. Sperm plasma-membrane-associated glutathione S-transferases as gamete recognition molecules. *Journal of Cell Science*. 2002;115(Pt 10):2053.
111. Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a Novel Family of Peroxidases. *IUBMB Life*. 2001;52(1):35-41.

112. Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends on Biochemical Science*. 2003;28(1):32-40.
113. O'Flaherty C, de Souza AR. Hydrogen peroxide modifies human sperm peroxiredoxins in a dose-dependent manner. *Biology of Reproduction*. 2011;84(2):238-47.
114. Gong S, San Gabriel MC, Zini A, Chan P, O'Flaherty C. Low amounts and high thiol oxidation of peroxiredoxins in spermatozoa from infertile men. *Journal of Andrology*. 2012;33(6):1342.
115. O'Flaherty C. Peroxiredoxins: hidden players in the antioxidant defence of human spermatozoa. *Basic and clinical andrology*. 2014;24(1):4.
116. Camejo MI, Abdala L, Vivas-Acevedo G, Lozano-Hernández R, Angeli-Greaves M, Greaves ED. Selenium, Copper and Zinc in Seminal Plasma of Men with Varicocele, Relationship with Seminal Parameters. *Biological Trace Elements Research*. 2011;143(3):1247-54.
117. Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Lombardo F, Terminali O, Passi S, *et al*. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. *Hum Reproduction*. 1994;9(11):2044.
118. Hogarth CA, Griswold MD. The key role of vitamin A in spermatogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(4):956-62.
119. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic Acid Protects Against Endogenous Oxidative DNA Damage in Human Sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 1991;88(24):11003-6.
120. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *Journal of Andrology*. 1996;17(5):530.
121. Boitani C, Puglisi R. Selenium, a key element in spermatogenesis and male fertility. *Advances in Experimental Medical Biology*. 2008;636:65.
122. Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, *et al*. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. 2010;20(6):711-23.
123. Agarwal A, Durairajanayagam D, du Plessis SS. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive biology and endocrinology*. 2014;12(1):112-.

124. Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. The Cochrane database of systematic reviews. 2011(1):CD007411.
125. Griveau JF, Le Lannou D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. International Journal of Andrology. 1994;17(5):225-31.
126. Said T, Agarwal A. Antioxidants in Sperm Cryopreservation. In: Male Infertility New York, NY: Springer New York; 2012. p. 431-7.
127. Smith TB, Dun MD, Smith ND, Curry BJ, Connaughton HS, Aitken RJ. The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. Journal of Cell Science. 2013;126(6):1488-97.
128. Norman DPG, Verdine GL, Bruner SD. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. Nature. 2000;403(6772):859-66.
129. Dantzer F, Bjørås M, Luna L, Klungland A, Seeberg E. Comparative analysis of 8-oxoG:C, 8-oxoG:A, A:C and C:C DNA repair in extracts from wild type or 8-oxoG DNA glycosylase deficient mammalian and bacterial cells. DNA Repair. 2003;2(6):707-18.
130. Gu A, Liang J, Lu N, Wu B, Xia Y, Lu C, *et al.* Association of XRCC1 gene polymorphisms with idiopathic azoospermia in a Chinese population. Asian Journal of Andrology. 2007;9(6):781-6.
131. Gu A, Ji G, Liang J, Xia Y, Lu N, Wu B, *et al.* DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and the risk of idiopathic azoospermia in a Chinese population. International Journal of Molecular Medicine. 2007;20(5):743-7.
132. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. Journal of Proteomics. 2010;73(10):1907-20.
133. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. Journal of Cell Biology. 2013;200(4):373-83.
134. Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. Journal of visualized experiments. 2012;59(59):e3037.
135. Sullivan R, Saez F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. Reproduction. 2013;146(1):R21.
136. Sullivan R. Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. Asian Journal of Andrology. 2015;17(5):726.

137. Martin-DeLeon PA. Epididymosomes: transfer of fertility-modulating proteins to the sperm surface. *Asian Journal of Andrology*. 2015;17(5):720.
138. Utleg AG, Yi EC, Xie T, Shannon P, White JT, Goodlett DR, *et al*. Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate*. 2003;56(2):150-61.
139. Vojtech L, Woo S, Hughes S, Levy C, Ballweber L, Sauteraud RP, *et al*. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(11):7290-304.
140. Jansen JWA, Brouwers JFHM, Stoorvogel W, Niel Gv, Stout TAE, Wauben MHM, *et al*. Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes. *Proteomics*. 2013;13(10-11):1660-6.
141. Wubbolts RW, Sostaric E, Nolte-t Hoen ENM, Stoorvogel W, Stout TAE, Wauben MHM, *et al*. Spermatozoa recruit prostasomes in response to capacitation induction. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins Proteomics*. 2013;1834(11):2326.
142. Aalberts M, Stout TAE, Stoorvogel W. Prostasomes: extracellular vesicles from the prostate. *Reproduction*. 2014;147(1):R1.
143. Burden HP, Holmes CH, Persad R, Whittington K. Prostasomes--their effects on human male reproduction and fertility. *Human Reproduction Update*. 2006;12(3):283-92.
144. Arienti G, Carlini E, Nicolucci A, Cosmi EV, Santi F, Palmerini CA. The motility of human spermatozoa as influenced by prostasomes at various pH levels. *Biology of the Cell*. 1999;91(1):51-4.
145. Carlsson L, Ronquist G, Stridsberg M, Johansson L. Motility stimulant effects of prostatesome inclusion in swim-up medium on cryopreserved human spermatozoa. *Archives of Andrology*. 1997;38(3):215.
146. Fabiani R, Johansson L, Lundkvist O, Ulmsten U, Ronquist G. Promotive effect by prostasomes on normal human spermatozoa exhibiting no forward motility due to buffer washings. *European Journal of Obstetric and Gynecology and Reproductive Biology*. 1994;57(3):181.
147. Wang J, Lundqvist M, Carlsson L, Nilsson O, Lundkvist Ö, Ronquist G. Prostatesome-like granules from the PC-3 prostate cancer cell line increase the motility of washed human spermatozoa and adhere to the sperm. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2001;96(1):88-97.

148. Siciliano L, Marcianò V, Carpino A. Protasome-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. *Reproductive biology and endocrinology*. 2008;6(1):5-.
149. Saez F, Motta C, Boucher D, Grizard G. Antioxidant capacity of protasomes in human semen. *Molecular Human Reproduction*. 1998;4(7):667-72.
150. Carlsson L, Pålsson C, Bergquist M, Ronquist G, Stridsberg M. Antibacterial activity of human protasomes. *Prostate*. 2000;44(4):279-86.
151. Kovac JR, Pastuszak AW, Lamb DJ. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertility and Sterility*. 2013;99(4):998-1007.
152. Lee R, Goldstein M, Ullery BW, Ehrlich J, Soares M, Razzano RA, et al. Value of Serum Antisperm Antibodies in Diagnosing Obstructive Azoospermia. *Journal of Urology*. 2009;181(1):264-9.
153. Johnson A, Bassham B, Lipshultz LI, Lamb DJ. A quality control system for the optimized sperm penetration assay. *Fertility and Sterility*. 1995;64(4):832-7.
154. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reproductive BioMedicine Online*. 2007;14(6):734-45.
155. Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, *et al*. Cytogenetics of infertile men. *Human Reproduction*. 1996;11(4):1-24.
156. Reijo R, Alagappan RK, Page DC, Patrizio P. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *The Lancet*. 1996;347(9011):1290-3.
157. Yu J, Chen Z, Ni Y, Li Z. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a sytemic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 2012;27:25-35.
158. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology*. 1999;17(3):121-7.
159. Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Messana I, Pontecorvi A, De Marinis L, *et al*. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertility and Sterility*. 2012;97(1):67-e1.
160. Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Castagnola M, Marana R. Proteomics of human seminal plasma: Identification of biomarker candidates for fertility and infertility

and the evolution of technology. *Molecular Reproductive Development*. 2013;80(5):350-7.

161. Deepinder F, Chowdary HT, Agarwal A. Role of metabolomic analysis of biomarkers in the management of male infertility. *Expert review of molecular diagnostics*. 2007;7(4):351.

162. Minai-Tehrani A, Jafarzadeh N, Gilany K. Metabolomics: a state-of-the-art technology for better understanding of male infertility. *Andrologia*. 2016;48(6):609-16.

163. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, *et al*. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*. 2005;84(4):833-42.

164. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*. 1996;68(5):850-8.

165. Köcher T, Pichler P, Schutzbier M, Stingl C, Kaul A, Teucher N, *et al*. High precision quantitative proteomics using iTRAQ on an LTQ Orbitrap: a new mass spectrometric method combining the benefits of all. *Journal of proteome research*. 2009;8(10):4743.

166. Ji C, Liu Z, Chen H, Guo H, Liu C. An association between hOGG1 Ser326Cys polymorphism and the risk of bladder cancer in non-smokers: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2012;12(1):335-.

167. Xiong D, Chen H, Ding X, Zhang S, Zhang J. Association of polymorphisms in glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with idiopathic azoospermia or oligospermia in Sichuan, China. *Asian Journal of Andrology*. 2015;17(3):481-6.

168. Kocabas N, Karahalil B. XRCC1 Arg399Gln Genetic Polymorphism in a Turkish Population. *International Journal of Toxicology*. 2006;25(5):419-22.

169. Suzen HS, Gucyener E, Sakalli O, Uckun Z, Kose G, Ustel D, *et al*. CAT C-262T and GPX1 Pro198Leu polymorphisms in a Turkish population. *Molecular Biology of Reproduction*. 2010;37(1):87-92.

170. Brans R, Dickel H, Bruckner T, Coenraads P, Heesen M, Merk HF, *et al*. MnSOD polymorphisms in sensitized patients with delayed-type hypersensitivity reactions to the chemical allergen para-phenylene diamine: A case-control study. *Toxicology*. 2005;212(2):148-54.

171. Kowalski M, Bielecka-Kowalska A, Oszajca K, Makandjou-Ola E, Jaworski P, Bartkowiak J, *et al.* Manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene (Ala-9Val, Ile58Thr) polymorphism in patients with age-related macular degeneration (AMD). *Medical Science Monitor.* 2010;16(4):CR190-6.
172. Olsen A, Lindeman B, Wiger R, Duale N, Brunborg G. How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicological Applied Pharmacology.* 2005;207(2):521-31.
173. Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim S, Sugimura H, *et al.* Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene.* 1998;16(25):3219-25.
174. Hill JW, Evans MK. Dimerization and opposite base-dependent catalytic impairment of polymorphic S326C OGG1 glycosylase. *Nucleic Acids Research.* 2006;34(5):1620-32.
175. Smart DJ, Chipman JK, Hodges NJ. Activity of OGG1 variants in the repair of pro-oxidant-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *DNA Repair.* 2006;5(11):1337-45.
176. Ji G, Yan L, Liu W, Qu J. OGG1 Ser326Cys polymorphism interacts with cigarette smoking to increase oxidative DNA damage in human sperm and the risk of male infertility. *Toxicological Letters.* 2013 -04-12;218(2):144-9.
177. Chen J, Wu S, Ji G, Gu A. Association of 8-hydroxyguanine glycosidase OGG1 Ser326Cys polymorphism with male infertility. *National journal of andrology.* 2014;20(6):518.
178. Thompson LH, West MG. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutation Research - DNA Repair.* 2000;459(1):1-18.
179. Radicella JP, Boiteux S, Hickson ID, Vidal AE. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO Journal.* 2001;20(22):6530-9.
180. Ahmed EA, de Boer P, Philippens MEP, Kal HB, de Rooij DG. Parp1-XRCC1 and the repair of DNA double strand breaks in mouse round spermatids. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2010;683(1-2):84-90.
181. Walter CA, Lu J, Bhakta M, Zhou Z, Thompson LH, McCarrey JR. Testis and somatic Xrcc-1 DNA repair gene expression. *Somatic Cell Molecular Genetics.* 1994;20(6):451-61.

182. Saadat M, Ansari-Lari M. Polymorphism of XRCC1 (at codon 399) and susceptibility to breast cancer, a meta-analysis of the literatures. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2009;115(1):137-44.
183. Zheng L, Wang X, Zhou D, Zhang J, Huo Y, Tian H. Association between XRCC1 single-nucleotide polymorphisms and infertility with idiopathic azoospermia in northern Chinese Han males. *Reproductive BioMedicine Online*. 2012;25(4):402-7.
184. Manente L, Pecoraro S, Picillo E, Gargiulo U, Gargiulo P, De Luca A, *et al*. Molecular Evidence of Apoptotic Pathway Activation in Semen Samples with High DNA Fragmentation. *In Vivo*. 2015;29(2):289-94.
185. Macanovic B, Vucetic M, Jankovic A, Stancic A, Buzadzic B, Garalejic E, *et al*. Correlation between sperm parameters and protein expression of antioxidative defense enzymes in seminal plasma: a pilot study. *Disease Markers*. 2015;2015:436236.
186. Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 2000;74(6):1200-7.
187. Oehninger S, Blackmore P, Mahony M, Hodgen G. Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction Genetics*. 1995;12(1):41-7.
188. Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 Genes Are Associated with Nonfamilial Idiopathic Dilated Cardiomyopathy in Japanese. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999;261(2):332-9.
189. Flekac M, Skrha J, Hilgertova J, Lacinova Z, Jarolimkova M. Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC medical genetics*. 2008;9(1):30-.
190. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman E, Vena JE, Marshall JR, *et al*. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Research*. 1999;59(3):602.
191. Woodson K, Tangrea JA, Lehman TA, Modali R, Taylor PR, Taylor KM, *et al*. Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Polymorphism, α -Tocopherol Supplementation and Prostate Cancer Risk in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study (Finland). *Cancer Causes & Control*. 2003;14(6):513-8.
192. Stoecklacher J, Ingles SA, Park DJ, Zhang W, Lenz H. The -9Ala/-9Val polymorphism in the mitochondrial targeting sequence of the manganese superoxide

dismutase gene (MnSOD) is associated with age among Hispanics with colorectal carcinoma. *Oncology Reports*. 2002;9(2):235.

193. Faure C, Leveille P, Dupont C, Julia C, Chavatte-Palmer P, Sutton A, *et al.* Are superoxide dismutase 2 and nitric oxide synthase polymorphisms associated with idiopathic infertility? *Antioxidants & redox signaling*. 2014;21(4):565.

194. Borgstahl GEO, Parge HE, Hickey MJ, Johnson MJ, Boissinot M, Hallewell RA, *et al.* Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry*. 1996;35(14):4287-97.

195. Chistiakov DA, Savost'ianov KV, Turakulov RI, Shcherbacheva LN, Mamaeva GG, Balabolkin MI, *et al.* Nucleotide substitution C1167T in the catalase gene and position of nearby polymorphic markers DS11S907 and D11S2008 are connected with development of diabetes mellitus type 2. *Molecular Biology*. 2000;34(5):863.

196. Hong Z, Tian C, Zhang X. GPX1 gene Pro200Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, and cancer risk. *Molecular Biology Reports*. 2013;40(2):1801-12.

197. Najafi M, Ghasemi H, Roustazadeh A, Farajollahi M. Lack of association between glutathione peroxidase1 (GPx1) activity, Pro198Leu polymorphism and stenosis of coronary arteries: A population-based prediction. *Meta gene*. 2014;2:722-9.

198. Hu YJ, Diamond AM. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: Loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Research*. 2003;63(12):3347-51.

199. Tirumala Vani G, Mukesh N, Siva Prasad B, Rama Devi P, Hema Prasad M, Usha Rani P, *et al.* Role of glutathione S-transferase Mu-1 (GSTM1) polymorphism in oligospermic infertile males: GSTM1 polymorphism in idiopathic infertile males. *Andrologia*. 2010;42(4):213-7.

200. Roshdy OH, Hussein TM, Zakaria NH, Sabry AA. Glutathione S-transferase Mu-1 gene polymorphism in Egyptian patients with idiopathic male infertility. *Andrologia*. 2015;47(5):587-93.

201. Wu W, Lu J, Tang Q, Zhang S, Yuan B, Li J, *et al.* GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms and male infertility risk: An updated meta-analysis encompassing 6934 subjects. *Scientific Reports*. 2013;3:2258.

202. Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, Perreault SD. GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to

air pollution. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2007;625(1-2):20-8.

203. Shiva M, Gautam AK, Verma Y, Shivgotra V, Doshi H, Kumar S. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clinical Biochemistry*. 2011;44(4):319-24.

204. Ramya T, Misro MM, Sinha D, Nandan D, Mithal S. Altered levels of seminal nitric oxide, nitric oxide synthase, and enzymatic antioxidants and their association with sperm function in infertile subjects. *Fertility and Sterility*. 2011;95(1):135-40.

205. Al-Azzawie H, Naeim M, Saleman E. Evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant status in seminal plasma of Iraqi infertile men. *International Journal of Advanced Research*. 2014;2:158-67.

206. Bousnane N, May S, Yahia M, Abu Alhaija A. Association of CAT-262C/T with the concentration of catalase in seminal plasma and the risk for male infertility in Algeria. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2017:1-8.

207. Tavailani H, Goodarzi MT, Vaisi-Raygani A, Salimi S, Hassanzadeh T. Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *International Brazilian Journal of Urology*. 2008;34(4):485-91.

208. Abdallah FB, Dammak I, Attia H, Hentati B, Ammar-Keskes L. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in infertile men: Correlation with semen parameter. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2009;23(2):99-104.

209. Zini A, Garrels K, Phang D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology*. 2000;55(6):922-6.

210. Hu J, Feng F, Zhu S, Sun L, Li G, Jiang N, *et al*. Catalase C-262T polymorphism and risk of prostate cancer: Evidence from meta-analysis. *Gene*. 2015;558(2):265-70.

211. Saygi S, Erol I, Alehan F, Yalcin Y, Kubat G, Atac F. Superoxide Dismutase and Catalase Genotypes in Pediatric Migraine Patients. *Journal of Child Neurology*. 2015;30(12):1586-90.

212. Castaldo SA, da Silva AP, Matos A, Inácio Â, Bicho M, Medeiros R, *et al*. The role of CYBA (p22phox) and catalase genetic polymorphisms and their possible epistatic interaction in cervical cancer. *Tumor Biology*. 2015;36(2):909-14.

213. Ahn J, Gammon MD, Santella RM, Gaudet MM, Britton JA, Teitelbaum SL, *et al*. Associations between breast cancer risk and the catalase genotype, fruit and vegetable

consumption, and supplement use. *American Journal of Epidemiology*. 2005;162(10):943-52.

214. Ahn J, Nowell S, McCann SE, Yu J, Carter L, Lang NP, *et al*. Associations between Catalase Phenotype and Genotype: Modification by Epidemiologic Factors. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2006;15(6):1217-22.

215. Quick SK, Shields PG, Nie J, Platek ME, McCann SE, Hutson AD, *et al*. Effect Modification by Catalase Genotype Suggests a Role for Oxidative Stress in the Association of Hormone Replacement Therapy with Postmenopausal Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2008;17(5):1082-7.

216. Saadat M, Saadat S. Genetic Polymorphism of CAT C-262 T and Susceptibility to Breast Cancer, a Case–Control Study and Meta-Analysis of the Literatures. *Pathology & Oncology Research*. 2014;21(2):433-7.

217. Zarafshan SS, Salehi Z, Salahi E, Sabet EE, Shabanipour S, Zahiri Z. Polymorphism of catalase gene (CAT C-262T) in women with endometriosis. *Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2014:1-3.

218. Ghaly M, Ghattas M, Labib S. Association of catalase gene polymorphisms with catalase activity and susceptibility to systemic lupus erythematosus in the Suez Canal area, Egypt. *Lupus*. 2012;21(11):1244-9.

219. Franko A, Dolžan V, Arnerić N, Dodič-Fikfak M. Asbestosis and Catalase Genetic Polymorphism. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2008;59(4):233-40.

220. Capurso A, Capurso C, Capurso SA, Solfrizzi V, D’Introno A, Colacicco AM, *et al*. Short arm of chromosome 11 and sporadic Alzheimer's disease: Catalase and cathepsin D gene polymorphisms. *Neuroscience Letters*. 2008;432(3):237-42.

221. Mak JCW, Leung HCM, Ho SP, Ko FWS, Cheung AHK, Ip MSM, *et al*. Polymorphisms in manganese superoxide dismutase and catalase genes: functional study in Hong Kong Chinese asthma patients. *Clinical & Experimental Allergy*. 2006;36(4):440-7.

222. Islam T, McConnell R, Gauderman WJ, Avol E, Peters JM, Gilliland FD. Ozone, Oxidant Defense Genes, and Risk of Asthma during Adolescence. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2008;177(4):388-95.

223. Khodayari S, Salehi Z, Fakhrieh Asl S, Aminian K, Mirzaei Gisomi N, Torabi Dalivandan S. Catalase gene C-262T polymorphism: Importance in ulcerative colitis:

Catalase polymorphism in ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013;28(5):819-22.

224. Ezzikouri S, Feydi AEE, Afifi R, Benazzouz M, Hassar M, Pineau P, *et al*. Polymorphisms in antioxidant defence genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Moroccan population. *Free Radicals Research*. 2010;44(2):208-16.

225. Perianayagam M. NADPH oxidase p22phox and catalase gene variants are associated with biomarkers of oxidative stress and adverse outcomes in acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;18(1):255-63.

226. Ahsan H, Chen Y, Kibriya MG, Islam MN, Slavkovich VN, Graziano JH, *et al*. Susceptibility to arsenic-induced hyperkeratosis and oxidative stress genes myeloperoxidase and catalase. *Cancer Lett*. 2003;201(1):57-65.

227. Bohanec Grabar P, Logar D, Tomšič M, Rozman B, Dolžan V. Genetic polymorphisms modifying oxidative stress are associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Disease Markers*. 2009;26(1):41-8.

228. Chistiakov DA, Savost'anov KV, Turakulov RI, Titovich EV, Zilberman LI, Kuraeva TL, *et al*. A new type 1 diabetes susceptibility locus containing the catalase gene (chromosome 11p13) in a Russian population. *Diabetes and Metabolism*. 2004;20(3):219-24.

229. Chistiakov D, Zotova E, Savost'anov K, Bursa T, Galeev I, Stokov I, *et al*. The 262T>C promoter polymorphism of the catalase gene is associated with diabetic neuropathy in type 1 diabetic Russian patients. *Diabetes and Metabolism*. 2006;32(1):63-8.

230. Dutkiewicz G, Domanski L, Pawlik A, Binczak-Kuleta A, Safranow K, Ciechanowicz A, *et al*. Polymorphisms of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Catalase Genes in Patients with Post-transplant Diabetes Mellitus. *Archives of Medical Research*. 2010;41(5):350-5.

231. Shen Y, Li D, Tian P, Shen K, Zhu J, Feng M, *et al*. The catalase C-262T gene polymorphism and cancer risk. *Medicine*. 2015;94(13).

232. Christiansen L, Petersen H, Bathum L, Frederiksen H, McGue M, Christensen K. The catalase -262C/T genotype promoter polymorphism and aging genotype. *Journal of Gerontology*. 2004;59:886-9.

233. Sabouhi S, Salehi Z, Bahadori MH, Mahdavi M. Human catalase gene polymorphism (CAT C-262T) and risk of male infertility. *Andrologia*. 2014;47(1):97-101.
234. Chen J, Zhang Z, Cai L. Diabetic Cardiomyopathy and Its Prevention by Nrf2: Current Status. *Diabetes & Metabolism Journal*. 2014;38(5):337-45.
235. Yu B, Huang Z. Variations in Antioxidant Genes and Male Infertility. *BioMedical research international*. 2015;2015:513196.
236. Chan K, Kan YW. Nrf2 Is Essential for Protection against Acute Pulmonary Injury in Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 1999;96(22):12731-6.
237. Chen K, Mai Z, Zhou Y, Gao X, Yu B. Low NRF2 mRNA expression in spermatozoa from men with low sperm motility. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2012;228(3):259-66.
238. Ahn J, Gammon MD, Santella RM, Gaudet MM, Britton JA, Teitelbaum SL, *et al*. Associations between breast cancer risk and the catalase genotype, fruit and vegetable consumption, and supplement use. *American Journal of Epidemiology*. 2005;162(10):943-52.
239. Nadif R, Mintz M, Jedlicka A, Bertrand J, Kleeberger SR, Kauffmann F. Association of CAT polymorphisms with catalase activity and exposure to environmental oxidative stimuli. *Free Radical Research*. 2005;39(12):1345-50.
240. Mak JCW, Ho SP, Yu WC, Choo KL, Chu CM, Yew WW, *et al*. Polymorphisms and functional activity in superoxide dismutase and catalase genes in smokers with COPD. *European Respiratory Journal*. 2007;30(4):684-90.
241. Poliakov A, Spilman M, Dokland T, Amling CL, Mobley JA. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. *Prostate*. 2009;69(2):159-67.
242. Ronquist KG, Ek B, Stavreus-Evers A, Larsson A, Ronquist G. Human prostasomes express glycolytic enzymes with capacity for ATP production. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*. 2013;304(6):576-82.
243. Yang C, Guo W-, Zhang W-, Bian J, Yang J-, Zhou Q-, *et al*. Comprehensive proteomics analysis of exosomes derived from human seminal plasma. *Andrology*. 2017;5(5):1007-15.
244. Ronquist KG, Ek B, Morrell J, Stavreus-Evers A, Ström Holst B, Humblot P, *et al*. Prostasomes from four different species are able to produce extracellular adenosine

triphosphate (ATP). *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2013;1830(10):4604-10.

245. Singleton S, Zalensky A, Doncel GF, Morshedi M, Zalenskaya IA. Testis/sperm-specific histone 2B in the sperm of donors and subfertile patients: Variability and relation to chromatin packaging. *Human Reproduction*. 2007;22(3):743-50.

246. Franchi NA, Avendaño C, Molina RI, Tissera AD, Maldonado CA, Oehninger S, *et al.* β -microseminoprotein in human spermatozoa and its potential role in male fertility. *Reproduction*. 2008;136(2):157-66.

247. da Silva B, Meng C, Helm D, Pachl F, Schiller J, Ibrahim E, *et al.* Towards Understanding Male Infertility After Spinal Cord Injury Using Quantitative Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2016;15(4):1424-34.

248. Pullar JM, Carr AC, Bozonet SM, Rosengrave P, Kettle AJ, Vissers MCM. Elevated seminal plasma myeloperoxidase is associated with a decreased sperm concentration in young men. *Andrology*. 2017;5(3):431-8.

249. Frenette G, Légaré C, Saez F, Sullivan R. Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *Molecular Human Reproduction*. 2005;11(8):575-82.

250. Aljabari B, Calogero A, Perdichizzi A, Vicari E, Karaki R, Lahloub T, *et al.* Imbalance in seminal fluid MIF indicates male infertility. *Molecular Medicine*. 2007;13(3-4):199-202.

251. Dias T, Alves M, Silva B, Oliveira P. Sperm glucose transport and metabolism in diabetic individuals. *Molecular Cell Endocrinology*. 2014;396(1-2):37-45.

252. Storey BT. Mammalian sperm metabolism: Oxygen and sugar, friend and foe. *Int J Developmental Biology*. 2008;52(5-6):427-37.

253. Nascimento JM, Shi LZ, Tam J, Chandsawangbhuwana C, Durrant B, Botvinick EL, *et al.* Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. *Journal of Cell Physiology*. 2008;217(3):745-51.

254. du Plessis S, Agarwal A, Mohanty G, van der Linde M. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use. *Asian Journal of Andrology*. 2015;17(2):230-5.

255. Hereng TH, Elgstøen KBP, Cederkvist FH, Eide L, Jahnsen T, Sklhegg BS, *et al.* Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 2011;26(12):3249-63.
256. Goldberg E, Eddy EM, Duan C, Odet F. LDHC: The ultimate testis-specific gene. *Journal of Andrology*. 2010;31(1):86-94.
257. Drabovich AP, Jarvi K, Diamandis EP. Verification of male infertility biomarkers in seminal plasma by multiplex selected reaction monitoring assay. *Molecular & cellular proteomics*. 2011;10(12):M110.004127.
258. Wang H, Zhou Z, Xu M, Li J, Xiao J, Xu Z, *et al.* A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *Journal of Molecular Medicine*. 2004;82(5):317-24.
259. Cao W, Haig-Ladewig L, Gerton GL, Moss SB. Adenylate Kinases 1 and 2 Are Part of the Accessory Structures in the Mouse Sperm Flagellum. *Biology of Reproduction*. 2006;75(4):492-500.
260. Vadnais M, Cao W, Aghajanian H, Haig-Ladewig L, Lin A, Al-Alao O, *et al.* Adenine Nucleotide Metabolism and a Role for AMP in Modulating Flagellar Waveforms in Mouse Sperm. *Biology of Reproduction*. 2014;90(6):128.
261. Legare C, Droit A, Fournier F, Bourassa S, Force A, Cloutier F, *et al.* Investigation of Male Infertility Using Quantitative Comparative Proteomics. *Journal of Proteome Research*. 2014;13(12):5403-14.
262. Walsh TJ. Male reproductive health and prostate cancer risk. *Current Opinions in Urology*. 2011;21(6):506-13.
263. Tvrdá E, Agarwal A, Alkuhaimi N. Male Reproductive Cancers and Infertility: A Mutual Relationship. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(4):7230-60.
264. Whitaker H, Warren A, Eeles R, Kote-Jarai Z, Neal D. The potential value of microseminoprotein- β as a prostate cancer biomarker and therapeutic target. *Prostate*. 2010;70(3):333-40.
265. Koochekpour S, Zhuang Y, Beroukhi R, Hsieh C, Hofer MD, Zhau HE, *et al.* Amplification and overexpression of prosaposin in prostate cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2005;44(4):351-64.
266. Olsson I, Ronquist G. Nucleic acid association to human prostasomes. *Archives of Andrology*. 1990;24(1):1-10.

267. Ronquist KG, Ronquist G, Carlsson L, Larsson A, *et al.* Human prostasomes contain chromosomal DNA. *Prostate*. 2009;69(7):737-43.
268. Ronquist GK, Larsson A, Stavreus-Evers A, Ronquist G, *et al.* Prostrasomes are heterogeneous regarding size and appearance but affiliated to one DNA-containing exosome family. *Prostate*. 2012;72(16):1736-45.
269. Ronquist GK, Larsson A, Ronquist G, Isaksson A, Hreinsson J, Carlsson L, *et al.* Prostrasomal DNA characterization and transfer into human sperm. *Molecular Reproduction and Development*. 2011;78(7):467-76.
270. Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of Neural Transmission*. 2010;117(1):1-4.

ANEXO I: PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

- Publicaciones ya enviadas a revistas científicas

1. Garcia-Rodriguez A, de la Casa M, Johnston SD, Gosálvez J, Roy R. Association of polymorphisms in genes coding for antioxidant enzymes and human male infertility. Aceptado provisionalmente por la revista Annals of Human Genetics.
2. García-Rodríguez A, de la Casa M, Peinado H, Gosálvez J, Roy R. Human prostasomes from normozoospermic and non-normozoospermic men show a differential protein expression pattern. Enviado a la revista Andrology.

- Publicaciones en revisión

1. Garcia-Rodriguez A, de la Casa M, Gosálvez J, Roy R. Polymorphisms OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg399Gln correlate with human male infertility.
2. Garcia-Rodriguez A, de la Casa M, Johnston SD, Gosálvez J, Roy R. CAT C-262T heterocygote genotypes correlates with higher catalase activity in seminal plasma and lower risk of male infertility.

ANEXO II: PRESENTACIONES EN CONGRESOS

- Comunicaciones orales

1. Garcia-Rodriguez A, de la Casa M, Gosálvez J, Roy R. El SNP CAT C-262T está asociado con la infertilidad masculina. 31º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad, Málaga, 2016.
2. García Rodríguez A, de la Casa M, Pacheco MI, Gosálvez J, Peinado H, Olmos D, Roy R. Caracterización de la carga de prostasomas presente en el plasma seminal de muestras normozoospermicas vs patológicas. IX Congreso de la Asociación Española para la Biología de la Reproducción (ASEBIR), Madrid, 2017.

- Posters

1. Garcia-Rodriguez A, de la Casa M, Gosálvez J, Roy R. XRCC1 polymorphism Arg399Gln is associated with male infertility. 32nd Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embriology (ESHRE), Helsinki, 2016.
2. Garcia-Rodriguez A, de la Casa M, Gosálvez J, Roy R. Estudio de la utilidad de los polimorfismos genéticos en infertilidad masculina. I Congreso Interdisciplinar en Genética Humana, Madrid, 2017.

**ANEXO III: PERMISO DEL
COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA
UAM**



COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

El Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, en su reunión del 5 de febrero de 2015, ha considerado las circunstancias que concurren en el proyecto de Tesis Doctoral "Análisis de nuevos marcadores de infertilidad masculina", que tiene como directora de tesis a la Dra. **Rosa Roy Barcelona** y como doctoranda a D^a **Anais García Rodríguez**.

A la vista de la documentación presentada este Comité ha acordado **informar favorablemente** los proyectos de investigación ya que cumplen los requisitos éticos requeridos para su ejecución.

Y para que así conste se firma en Madrid a 6 de febrero de 2015

Isabel Martínez Cabañas

Secretaria del CEI



Nuria Fernández Monsalve

Presidenta del CEI

AGRADECIMIENTOS

Cuando mi periodo de doctorado se va agotando y mi redacción de tesis está en plena escritura, es el momento de redactar mis agradecimientos y, aunque parezca esta una parte de menor importancia que los apartados puramente científicos, es para mi persona muy importante, en tanto en cuanto significa tener que realizar una reflexión sobre lo que ha supuesto este doctorado para mí.

La valoración es positiva y doble. Por un lado he podido realizar un doctorado en Madrid, conocer más a fondo el mundo de la investigación, conocer los entresijos de un laboratorio, conocer a compañeros jóvenes llenos de ilusión y a no tan jóvenes llenos de experiencia, y por otro he podido tomar contacto directo con las aulas, con alumnos y profesores expertos de los que siempre se aprende. Además he podido vivir de forma directa la vida cultural de Madrid, como conferencias del señor Punsent o de la Real Academia de la Ciencias, museos, exposiciones y todo lo que en una pequeña ciudad de provincias como la mía son ilusiones como asistir a una visita guiada por la Biblioteca Nacional, acudir al teatro a ver a mi ídolo Arturo Fernández o disfrutar de un concierto en el Teatro Real. Por todo ello y como dice la canción, “Doy gracias a la vida, que me ha dado tanto”.

Pasando ya a los agradecimientos concretos, espero no olvidarme de nadie pero si así ocurriese, ya suplico perdón por adelantado.

- Agradecimientos institucionales:
 - Gracias a la Universidad Autónoma de Madrid por concederme el puesto de Profesor Ayudante del Área de Genética, gracias al cual he podido tener desahogo económico durante los 4 años de doctorado. Gracias también por las ayudas económicas recibidas para realizar mi estancia predoctoral y para asistir a congresos internacionales a presentar mi trabajo.
 - Gracias al Krefting Research Centre de la Universidad de Gotemburgo, Suecia, por aceptarme para realizar una estancia predoctoral.
 - Gracias al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) por permitirme realizar una estancia de 6 meses en sus laboratorios para realizar la investigación con exosomas.
 - Gracias a la Clínica Ginefiv de Madrid por facilitar las muestras utilizadas en mi investigación.
- Agradecimientos intelectuales:
 - Gracias a D. Paulino de Paz, profesor de la asignatura Biotecnología de la Reproducción de la Universidad de León por descubrirme el mundo de la infertilidad e inculcarme su amor por este campo.
 - Gracias a D. Pedro José Fernández, director del Laboratorio de Reproducción Asistida del Hospital Universitario La Fe de Valencia por sus enseñanzas, su paciencia, sus consejos y por dirigir la investigación de mi primer máster.

- Gracias a D. Jaime Gosalvez, catedrático de genética de la Universidad Autónoma de Madrid por creer en mí y dirigir el la investogación de mi segundo máster.
- Gracias a D. Rosa Roy, profesora titular de genética de la Universidad Autónoma de Madrid, por aceptar la dirección de mi tesis doctoral y por la convivencia, con sus buenos y malos momentos, los buenos porque son buenos y los malos porque me han ayudado a forjarme.
- Gracias a Jan Lötvall, director del Krefting Research Centre de la Universidad de Gotemburgo, por dirigir mi investigación durante mi estancia en dicho centro, por su excelente enseñanza, su capacidad de integrarme y sus conversaciones conmigo. Extiendo mi agradecimiento a todo su equipo.
- Gracias a todos mis compañeros del área de genética, Begoña, Carlos I, Carlos II, Carmen, Joaquina, Miguel, Paqui, Pepe I y Pepe II, por aceptarme como a una más y por escucharme en los momentos alegres y en los dolorosos, que ni unos ni otros faltaron.
- Gracias a D. David Olmos, director del grupo de cáncer de próstata del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, y a D. Héctor Peinado, director del grupo de microambiente y metástasis del mismo centro, por permitirme acceder a sus laboratorios y utilizar su equipamiento para realizar los aislamientos de exosomas necesarios para llevar a cabo la segunda parte de mi tesis doctoral. Extiendo mi agradecimiento a todos los miembros de ambos equipos.
- Gracias a la Unidad de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, a la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid y a Dña. Malena Serrano Noreña del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) por su ayuda en la realización de algunas de las técnicas experimentales que he empleado en esta tesis.
- Gracias a Dña. María José Gómez, Ivo Fernández y Mariam Ameri, por haberme enseñado pacientemente algunas de las técnicas experimentales que he empleado en esta tesis.
- Gracias a D. Moisés de la Casa de la Clínica GINEFIV, por su colaboración a la hora de facilitar las muestras utilizadas en mi investigación.
- Gracias a D. Javier Bartolomé, director de investigación de la empresa Halotech S.A., porque, a pesar de conocernos tan poco tiempo, ha sabido escuchar y apoyar en los duros momentos.
- Agradecimientos personales:
 - Gracias a mis abuelos maternos, Francisco y Aurelia, que ya no están pero siguen estando. Gracias abuelo por ser tan serio como yo pero también tan entero como yo quiero llegar a ser y gracias abuela por quererme tanto y considerarme siempre “tu niña”.
 - Gracias a mis padres, Florencio y Gloria, por reír conmigo y llorar conmigo, y por apoyarme en mi licenciatura, en mis dos másteres y en mi doctorado.

ESTUDIO DE NUEVOS MARCADORES DE INFERTILIDAD MASCULINA

Tesis doctoral para la obtención del Doctorado en Biología RD 99/2011 con Mención de Doctorado Internacional por la Universidad Autónoma de Madrid

En Madrid, a 28 de enero de 2018

Anaís García Rodríguez